

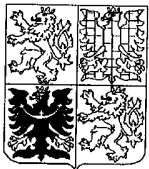
PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

1999 - 3575

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **06.04.1998**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **09.04.1997 24.02.1998**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **1997/9704356 1998/9802212**

(33) Země priority: **FR FR**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **14.06.2000**
(Věstník č. 6/2000)

(86) PCT číslo: **PCT/FR98/00691**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO98/45323**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:

C 07 K 14/16

C 12 N 7/00

A 61 P 37/04

(71) Přihlašovatel:

PASTEUR SANOFI DIAGNOSTICS,
Marnes la Coquete, FR;

(72) Původce:

Chenebaux Denis Marie Bernard, Versailles,
FR;
Delagneau Jean-Francois Hubert,
La Celle Saint Cloud, FR;
Gadelle Stéphane Jean Xavier, Bièvres, FR;
Rieunier Francois Yves, Fontenay le Fleury,
FR;

(74) Zástupce:

Kalenský Petr JUDr., Hálkova 2, Praha 2,
120 00;

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Syntetický peptid použitelný v biologických
testech pro detekci infekcí způsobených viry
HIV-1 skupiny O**

(57) Anotace:

Syntetický peptid monomerní se 13 až 33 aminokyselinami
nebo dimerní se 26 až 66 aminokyselinami, lineární nebo
cyklický s intercysteinovými sírovými můstky, použitelný
v biologických testech pro detekci infekcí, způsobených viry
HIV-1 skupiny O, způsob jeho přípravy a kity, obsahující
takové peptidy.

Syntetický peptid použitelný v biologických testech pro detekci infekcí způsobených viry HIV-1 skupiny O

Oblast techniky

Vynález se týká syntetických peptidů použitelných v biologických testech pro detekci infekcí způsobených viry HIV 1 skupiny O, způsobů přípravy těchto peptidů, kitů obsahujících tyto peptidy a biologických zkoušek za použití těchto peptidů, farmaceutických prostředků, které tyto peptidy obsahují a biologických zkoušek, prováděných za použití těchto peptidů.

Dosavadní stav techniky

Retroviry HIV-1 skupiny O jsou známy. Evropský patentový spis číslo O 345375 a zveřejněná evropská přihláška vynálezu číslo EP 0657532 popisují izoláty ANT 70 a ANT 70 NA izolované od kamerunských nemocných jedinců. Uvedené spisy se zvláště týkají antigenů sloučenin antigenních obsahujících lyzáty nebo proteiny z těchto izolátů, nukleových kyselin odpovídajících genomickým ARN, způsobů hybridizace za získání těchto nukleových kyselin, způsobů přípravy shora uvedených izolátů a způsobů přípravy proteinů p12, p16, p25, gp41, gp120 těchto retrovirů.

Zveřejněná evropská přihláška vynálezu číslo EP 0591914 popisuje izolát MVP 5180/91. Tento izolát, charakterizovaný způsobem Western Blot, jako předchozí izolát, uvádí rozdíly ve vztahu k izolátům retroviru HIV-1, již známým. Zveřejněná evropská přihláška vynálezu číslo EP 0591914 popisuje přesně sekvenci ADN izolátu MVP 5180/91 a vyznačuje přesně umístění genů gag, pol a env. V této přihlášce vynálezu EP 0591914 se také popisují syntetické peptidy smyčky V3 a imunodominantní oblast (gp41). Tyto oblasti se hodí pro biologické zkoušky,

zvláště pro detekci in vitro protilátek HIV-1 skupiny O.

Zveřejněná evropská přihláška vynálezu číslo EP 0673948 popisuje syntetické nebo rekombinované peptidy sestávající z 15 až 50 aminokyselin (AA) se sekvencí

-VWGIRQLRRLQALETLIQNQQRLNLWGXXGKGLIXYTSVKWNTSWSGR-

kde znamená X zbytek cysteinu nebo serinu. Těchto peptidů se používá v diagnostice pro detekci infekcí způsobovaných určitými izoláty retroviru HIV-1 skupiny O.

Rovněž je známa zveřejněná evropská přihláška vynálezu číslo EP O 727483, která popisuje izolát MVP 2901/94, který je rovněž součástí retroviru z rodiny HIV-1 skupiny O. Tato přihláška vynálezu popisuje určité antigeny mající peptidové dobře vymezené sekvence. Tyto peptidové sekvence odpovídají části sekvence gp120 a části sekvence gp41 (imunodominantní oblasti) izolátu MVP 2901/94.

Zveřejněná přihláška vynálezu WO 96/12809 popisuje dva nové izoláty příslušející do rodiny HIV-1 skupiny O. Jde o izoláty VAU a DUR. Jsou popsány určité peptidové sekvence pocházející ze dvou popisovaných virů, vhodné k detekci protilátek rozeznávajících peptidové sekvence HIV-1 VAU a DUR.

Zveřejněná přihláška vynálezu WO 96/32293 popisuje dva antigeny pocházející ze sekvence izolátu ANT 70. Jde o antigen nazvaný MDL061 a antigen MDL056 imunodominantní oblasti gp41. Uvádí se, že k detekci 100 % vzorků jedné omezené kolekce sér nemocných, infikovaných virem HIV-1 skupiny O, je třeba použít sloučenin obsahujících tyto dva peptidy, jelikož každý izolovaný peptid neumožňuje sám o sobě získat uspokojivé výsledky.

Ve skutečnosti je téměř nemožné, vzhledem ke genetické variabilitě, kterou se vyznačují izoláty viru skupiny O, zaru-

čit serologické vystopování jedinců kontaminovaných zavedením antigenů pocházejících z jednoho a téhož izolátu. To znamená, že není možno získat reagentie, které zaručují 100% citlivost. Skupina O tak představuje především významný problém: jde o nepřiměřenost některých sérologických reagentů k rozeznání jedinců kontaminovaných obzvláště divergentními skupinami nebo podskupinami. To přesně je případ HIV-1 skupiny O.

Zveřejněná přihláška vynálezu WO 96/40763 také trvá na velké divergenci skupiny O. Popisují se peptidy, které začleňují do přírodní sekvence HIV-1 typu B některé drobné modifikace (náhradu jedné nebo dvou aminokyselin). Uvádějí se hybridní peptidy schopné reagovat s protilátkami proti skupině O.

Ve zveřejněné přihlášce vynálezu WO 96/27013 se popisuje řada nových virů HIV skupiny O, označovaných BCF 01, BCF 02, BCF 03, BCF 06, BCF 07, BCF 08, BCF 09, BCF 11, BCF 12, BCF 13 a BCF 14 a řada peptidů dominantní oblasti odpovídajících gp41, pojmenovaných ESS/BCF02, FAN/BCF01, LOB/BCF06, MAN/BCF07, NKO/BCF08, POC/BCF03, NAN/BCF11, BCF09, BCF12, BCF13, BCF14. Určitý počet těchto peptidů je špatně zpracovatelný při diagnostice vzhledem k jejich slabé rozpustnosti, zejména peptid BCF13.

Zcela neočekávatelně se nyní zjistilo, že určité syntetické peptidy jsou diagnosticky hodnotněji reaktivní a umožňují dostatečným způsobem identifikovat nemocné nakažené retrovirem HIV-1 skupiny O. Tyto peptidy sestávají z rozmanitých sekvencí seskupených kolem velmi zachovalých krátkých sekvencí, obsažených v izolátech retroviru HIV-1 skupiny O. Peptidy podle vynálezu umožňují dosahovat lepších výsledků, než jakých se dosahovalo se syntetickými peptidovými nosiči imunodominantních epitopů gp41 (env) určitých izolátů HIV-1 skupiny O.

V dalším textu je k pojmenování aminokyselin použito třípísmenových kódů.

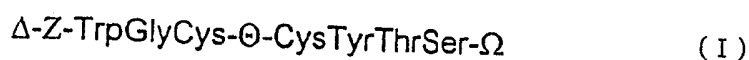
21.12.99

PV 1999-3575

C.J. 87677

Podstata vynálezu

Podstatou vynálezu jsou syntetické peptidy obecného vzorce I



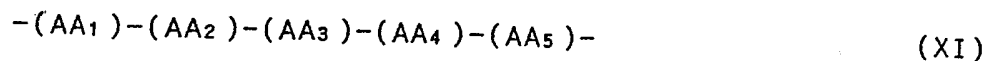
kde znamená
delta skupinu biotinylovou, biocytinylovou, atom vodíku, skupinu acetylovou (CH_3CO)-, alifatický řetězec, obsahující po případě jednu nebo dvě skupiny thiolové, aldehydové nebo aminoskupiny, alifatický řetězec, kterým je s výhodou řetězec alkylový s 1 až 6 atomy uhlíku, nebo řetězec alkenylový se 2 až 6 atomy uhlíku nebo řetězec aminoalkylkarbonylový se 2 až 6 atomy uhlíku,

Z znamená peptidovou sekvenci obecného vzorce II až X

- Ξ_1 -Ser- Ξ_2 - (II)
- Ser- Ξ_2 - (III)
- Ξ_1 -Ser- (IV)
- Ξ_1 -Gln- Ξ_2 - (V)
- Gln- Ξ_2 - (VI)
- Ξ_1 -Gln- (VII)
- Ξ_1 -Asn- Ξ_2 - (VIII)
- Asn- Ξ_2 - (IX)
- Ξ_1 -Asn- (X)

kde

- Ξ_1 znamená peptidovou sekvenci 0 až 9 aminokyselin,
- Ξ_2 znamená peptidovou sekvenci 0 až 5 aminokyselin,
- Θ znamená peptidovou sekvenci obecného vzorce XI:



kde znamená

(AA_1) lysinový, argininový nebo ornithinový zbytek,

- (AA₂) glycinový nebo asparaginový zbytek
 (AA₃) lysinový, argininový nebo ornithinový zbytek
 (AA₄) leucinový, alaninový, isoleucinový nebo glutaminový zbytek
 (AA₅) isoleucinový, valinový, leucinový, threoninový, norleucinový nebo norvalinový zbytek,

za předpokladu, že (AA₁), (AA₂), (AA₃), (AA₄) a (AA₅) netvoří nikdy seskupení peptidových sekvencí -Lys Gly Lys Leu Ile a Lys Gly Lys Leu Val-,

- Ω vázaný na skupinu -CO- serinu znamená
- hydroxylovou skupinu (-OH) nebo aminoskupinu (-NH₂),
- alkoxylovou skupinu s 1 až 6 atomy uhlíku,
- peptidovou skupinu obecného vzorce XII



kde Σ znamená sekvenci obecného vzorce XIII nebo obecného vzorce XIV



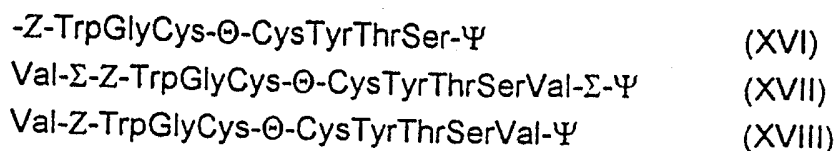
kde znamená

- (AA₆) aminokyselinu jinou než lysin,
 (AA₇) aminokyselinu,
 (AA₈) serinový nebo threoninový zbytek
 a Ψ fixovaný na zbytek -CO- volné aminokyseliny AA₈ znamená skupinu OH, NH₂ nebo alkoxy skupinu s 1 až 6 atomy uhlíku,
 - peptidovou sekvenci obecného vzorce XV



kde Ψ fixovaný na zbytek -CO- valinu má stejný význam jako u obecného vzorce XII,
 -nebo jednu z peptidových sekvencí obecného vzorce XVI až XVIII

21.12.99



kde Z a Θ mají shora u obecného vzorce I uvedený význam a Σ má význam uvedený u obecného vzorce XII a Ψ fixovaný na zbytek -CO- serinu, na zbytek -CO- aminokyseliny AA₅ nebo na zbytek -CO- valinu má stejný význam jako u obecného vzorce XII.

Když Ω představuje peptidovou sekvenci jednoho z obecných vzorců XVI až XVIII, stává se peptid obecného vzorce I dimerem, jehož tvar se může měnit ve 26 až 66 aminokyselinách. Když Ω nepředstavuje peptidovou sekvenci jednoho z obecných vzorců XVI až XVIII, jsou peptidy obecného vzorce I monomerního typu a jejich forma se může měnit ve 13 až 33 aminokyselinách.

Peptidy podle vynálezu mohou být buď ve formě lineární, nebo ve formě cyklické prostřednictvím intercysteinových disulfidových můstků.

Přednost se dává sloučeninám obecného vzorce I, kde znamená (AA₅) zbytek valinový, leucinový nebo threoninový, a pokud znamená Ω znamená peptidovou sekvenci obecného vzorce XII, znamená (AA₆) buď glutaminový nebo argininový zbytek.

Přednost se dává sloučeninám obecného vzorce I, kde znamená

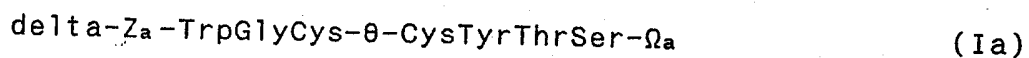
- delta biotinylovou skupinu, atom vodíku nebo alifatický řetězec, který může obsahovat jednu nebo dvě thiolové, aldehydové nebo aminové skupiny, přičemž alifatický řetězec je s výhodou alkylový s 1 až 6 atomy uhlíku, nebo aminoalkyl-karbonylový se 2 až 6 atomy uhlíku,

- Z peptidovou sekvenci obecného vzorce II nebo V, kde znamená peptidovou sekvenci se dvěma aminokyselinami a aminokyselinu nebo sekvenci obecného vzorce IV, kde znamená tři aminokyseliny, nebo peptidovou sekvenci obecného vzorce VIII, kde znamená peptidovou sekvenci devíti, osmi nebo tří aminokyselin a peptidickou sekvenci pěti aminokyselin,
- θ peptidovou sekvenci vzorce
 - Lys Gly Arg Leu Val-,
 - Arg Gly Lys Ala Val-,
 - Arg Gly Arg Leu Val-, nebo
 - Arg Gly Arg Ala Val- a
- Ω hydroxylovou skupinu, peptidovou sekvenci XV nebo jednu z následujících sekvencí, které odpovídají peptidové sekvenci vzorce XII:
 - Val Arg Trp Asn Glu Thr-Ψ,
 - Val Gln Trp Asn Glu Thr-Ψ
 - Val Gln Trp Asn Ser Thr-Ψ.

S výhodou Z znamená peptidovou sekvenci vzorce

- Leu Leu Ser Ser-
- Leu Leu Asn Ser-
- Leu Leu Dln Ser-
- Arg Leu Asn Ser-
- Ala Leu Glu Thr Leu Leu Gln Asn Gln Gln Leu Leu Asn Ser-
- Ala Leu Glu Thr Leu Leu Gln Asn Gln Gln Leu Leu Asn Leu-
- Ala Leu Glu Thr Leu Leu Gln Asn Gln Gln Leu Leu Asn Ile-
- Leu Asn Gln Gln Arg Leu Asn Ser- nebo
- Arg Ala Leu Glu Thr Leu Leu Asn Gln Gln Arg Leu Leu Asn Ser-.

Vynález se týká také syntetických peptidů zahrnujících 20 až 50 aminokyselin a odpovídajících obecnému vzorce Ia:



kde znamená Z_a skupinu vzorce IIa až Xa:

21.12.99

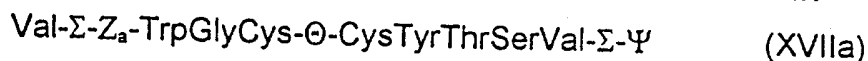
- Ξ_{1a} -Ser- Ξ_{2a} (IIa)
- Ser- Ξ_{2a} (IIIa)
- Ξ_{1a} -Ser (IVa)
- Ξ_{1a} -Gln- Ξ_{2a} (Va)
- Gln- Ξ_{2a} (VIa)
- Ξ_{1a} -Gln- (VIIa)
- Ξ_{1a} -Asn- Ξ_{2a} (VIIIa)
- Asn- Ξ_{2a} (IXa)
- Ξ_{1a} -Asn (Xa)

kde znamená

- Ξ_{1a} peptidovou sekvencí jedné až pěti aminokyselin

- Ξ_{2a} jednu aminokyselinu

Ω_a peptidovou sekvencí obecného vzorce XII, obecného vzorce (I), nebo peptidovou sekvencí obecného vzorce XVIIa:



kde Z_a má význam uvedený u obecného vzorce Ia

a δ , θ , Σ a Ψ mají stejný význam jako u obecného vzorce I.

Přednost se dává peptidům obecného vzorce I nebo Ia zahrnujícím jednu z následujících sekvencí (tyto peptidy mohou být monomerního nebo dimerního typu, jak shora uvedeno). V dalším textu je k pojmenování aminokyselin použito třípísmenových kódů.

Sekvence č. 1

-LLSLWGCRGKAVCYTSVQWNET-

nebo

-Leu Leu Ser Leu Trp Gly Cys Arg Gly Lys Ala Val Cys Tyr Thr Ser Val Gln Trp Asn

1

5

10

15

20

Glu Thr-

22

Sekvence č. 2

-LLSLWGCRGRLVCYTSVQWNET-

nebo

-Leu Leu Ser Leu Trp Gly Cys Arg Gly Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser Val Gln Trp Asn

1

5

10

15

20

Glu Thr-

22

21.12.99

Sekvence č. 3

-LLSSWGCKGRLVCYTSVQWNET-

nebo

-Leu Leu Ser Ser Trp Gly Cys Lys Gly Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser Val Gln Trp Asn
 1 5 10 15 20
 Glu Thr-
 22

Sekvence č. 4

-LLSSWGCKGRLVCYTSVQWNST-

nebo

-Leu Leu Ser Ser Trp Gly Cys Lys Gly Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser Val Gln Trp Asn
 1 5 10 15 20
 Ser Thr-
 22

Sekvence č. 5

-LLQSWGCKGRLVCYTSVQWNST-

nebo

-Leu Leu Gln Ser Trp Gly Cys Lys Gly Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser Val Gln Trp Asn
 1 5 10 15 20
 Ser Thr-
 22

Sekvence č. 6

-LLNSWGCRGKAVCYTSVQWNET-

nebo

-Leu Leu Asn Ser Trp Gly Cys Arg Gly Lys Ala Val Cys Tyr Thr Ser Val Gln Trp Asn
 1 5 10 15 20
 Glu Thr-
 22

Sekvence č. 7

-LLSLWGCRGRAVCYTSVQWNET-

nebo

-Leu Leu Ser Leu Trp Gly Cys Arg Gly Arg Ala Val Cys Tyr Thr Ser Val Gln Trp Asn
 1 5 10 15 20

Glu Thr-
 22

Sekvence č. 8

-LLSSWGCRGRLVCYTSVQWNET-

nebo

-Leu Leu Ser Ser Trp Gly Cys Arg Gly Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser Val Gln Trp Asn
 1 5 10 15 20

Glu Thr-
 22

Sekvence č. 9

-LLSSWGCKGRLVCYTS-

nebo

-Leu Leu Ser Ser Trp Gly Cys Lys Gly Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser-
 1 5 10 15

Sekvence č. 10

-LLNSWGCKGRLVCYTS-

nebo

-Leu Leu Asn Ser Trp Gly Cys Lys Gly Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser-
 1 5 10 15

Sekvence č. 11

-ALETLLQNQQLLNSWGCRGRLVCYTSVRWNET-

nebo

-Ala Leu Glu Thr Leu Leu Gln Asn Gln Gln Leu Leu Asn Ser Trp Gly Cys Arg Gly
 1 5 10 15
 Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser Val Arg Trp Asn Glu Thr-
 20 25 30

21.12.99

Sekvence č. 12

-ALETLLQNQQLLNIWGCRGRLVCYTSVRWNET-

nebo

-Ala Leu Glu Thr Leu Leu Gln Asn Gln Gln Leu Leu Asn Ile Trp Gly Cys Arg Gly

1

5

10

15

Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser Val Arg Trp Asn Glu Thr-

20

25

30

Sekvence č. 13

-ALETLLQNQQLLDLWGCRGRLVCYTSVRWNET-

nebo

-Ala Leu Glu Thr Leu Leu Gln Asn Gln Gln Leu Leu Asp Leu Trp Gly Cys Arg Gly

1

5

10

15

Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser Val Arg Trp Asn Glu Thr-

20

25

30

Sekvence č. 14

-LNQQRLLNSWGCKGRLVCYTSV-

nebo

-Leu Asn Gln Gln Arg Leu Leu Asn Ser Trp Gly Cys Lys Gly Arg Leu Val Cys Tyr

1

5

10

15

Thr Ser Val-

20

Sekvence č. 15

-RALETLLNQQRLLNSWGCKGRLVCYTSV-

nebo

- Arg Ala Leu Glu Thr Leu Leu Asn Gln Gln Arg Leu Leu Asn Ser Trp Gly Cys Lys

1

5

10

15

Gly Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser Val-

20

25

21.12.99

Sekvence č. 16

-RLNSWGCKGRLVCYTSV-

nebo

- Arg Leu Asn Ser Trp Gly Cys Lys Gly Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser Val-

1

5

10

15

Obzvláště výhodnými jsou následující syntetické peptidy:

Peptid č. 1 (2B): SEQ ID N° 1

LLSLWGCRGKAVCYTSVQWNET

nebo

Leu Leu Ser Leu Trp Gly Cys Arg Gly Lys Ala Val Cys Tyr Thr Ser Val Gln Trp Asn

1

5

10

15

20

Glu Thr

22

Peptid č. 2 (3B): SEQ ID N° 2

LLSLWGCRGRLVCYTSVQWNET

nebo

Leu Leu Ser Leu Trp Gly Cys Arg Gly Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser Val Gln Trp Asn

1

5

10

15

20

Glu Thr

22

Peptid č. 3 (4B): SEQ ID N° 3

LLSSWGCKGRLVCYTSVQWNET

nebo

Leu Leu Ser Ser Trp Gly Cys Lys Gly Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser Val Gln Trp Asn

1

5

10

15

20

Glu Thr

22

Peptid č. 4 (5B): SEQ ID N° 4

LLSSWGCKGRLVCYTSVQWNST

nebo

21.12.99

Leu Leu Ser Ser Trp Gly Cys Lys Gly Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser Val Gln Trp Asn
 1 5 10 15 20
 Ser Thr
 22

Peptid č. 5 (6B): SEQ ID N° 5

LLQSWGCKGRLVCYTSVQWNST.

nebo

Leu Leu Gln Ser Trp Gly Cys Lys Gly Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser Val Gln Trp Asn
 1 5 10 15 20
 Ser Thr
 22

Peptid č. 6: SEQ ID N° 6

LLNSWGCRGKAVCYTSVQWNET

nebo

Leu Leu Asn Ser Trp Gly Cys Arg Gly Lys Ala Val Cys Tyr Thr Ser Val Gln Trp Asn
 1 5 10 15 20
 Glu Thr
 22

Peptid č. 7: SEQ ID N° 7

LLSLWGCRGRAVCYTSVQWNET

nebo

Leu Leu Ser Leu Trp Gly Cys Arg Gly Arg Ala Val Cys Tyr Thr Ser Val Gln Trp Asn
 1 5 10 15 20
 Glu Thr
 22

Peptid č. 8 (7B): SEQ ID N° 8

LLSSWGCRGRLVCYTSVQWNET

nebo

Leu Leu Ser Ser Trp Gly Cys Arg Gly Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser Val Gln Trp Asn
 1 5 10 15 20
 Glu Thr
 22

21.12.99

Peptid č. 9 (12B) : SEQ ID N° 9

LLSSWGCKGRLVCYTS

nebo

Leu Leu Ser Ser Trp Gly Cys Lys Gly Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser
1 5 10 15

Peptid č. 10 (14B) : SEQ ID N° 10

LLNSWGCKGRLVCYTS

nebo

Leu Leu Asn Ser Trp Gly Cys Lys Gly Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser
1 5 10 15

Peptid č. 11 (18B) : SEQ ID N° 11

ALETLLQNQQLLSWGCRGRLVCYTSVRWNET

nebo

Ala Leu Glu Thr Leu Leu Gln Asn Gln Gln Leu Leu Asn Ser Trp Gly Cys Arg Gly
1 5 10 15
Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser Val Arg Trp Asn Glu Thr
20 25 30

Peptid č. 12 (19B) : SEQ ID N° 12

ALETLLQNQQLLNIWGCRGRLVCYTSVRWNET

nebo

Ala Leu Glu Thr Leu Leu Gln Asn Gln Gln Leu Leu Asn Ile Trp Gly Cys Arg Gly
1 5 10 15
Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser Val Arg Trp Asn Glu Thr
20 25 30

Peptid č. 13 (20B) : SEQ ID N° 13

ALETLLQNQQLLDLWGCRGRLVCYTSVRWNET

nebo

21.12.99

14₂

-Ala Leu Glu Thr Leu Leu Gln Asn Gln Gln Leu Leu Asp Leu Trp Gly Cys Arg Gly
1 5 10 15
Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser Val Arg Trp Asn Glu Thr
20 25 30

Peptid č. 14 (21B): SEQ ID N° 14

LNQQRLLNSWGCKGRLVCYTSV

nebo

Leu Asn Gln Gln Arg Leu Leu Asn Ser Trp Gly Cys Lys Gly Arg Leu Val Cys Tyr
1 5 10 15
Thr Ser Val
20

Peptid č. 15 (22B): SEQ ID N° 15

RALETLLNQQRLLNSWGCKGRLVCYTSV

nebo

Arg Ala Leu Glu Thr Leu Leu Asn Gln Gln Arg Leu Leu Asn Ser Trp Gly Cys Lys
1 5 10 15
Gly Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser Val
20 25

Peptid č. 16 (23B): SEQ ID N° 16

RLNSWGCKGRLVCYTSV

nebo

Arg Leu Asn Ser Trp Gly Cys Lys Gly Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser Val
1 5 10 15

21.12.99

Syntetické peptidy obecného vzorce I podle vynálezu se získají syntesou v pevné fázi klasickými způsoby popsány v literatuře (R.B. Merrifield J.Amer.Chem.Soc. 85, str. 2149 až 2154, 1963); R.C. Sheppard "Peptides 1971", Nsvadba H. (vydavatel) North Holland Amsterdam str. 111; E. Atherton a R.L. Sheppard "Solid phase peptide synthesis, a practical approach" IRL PRESS (1989), Oxford University Press, str. 25 až 34. Jako automatického syntetizátoru je možno použít syntetizátoru "9050 Plus Pep Synthetizer" Millipore nebo rovnocenného zařízení.

Pevný nosič, kterého se při syntese používá, má odpovídat použité chemické technice. Například pro syntesu na syntetizátoru "9050 Plus Pep Synthetizer" se doporučuje pryskyřice přizpůsobená technice "ve vznosu"; těmto kritériím vyhovují pryskyřice PEG PS. Nosiče jsou tvořeny mezerníkem ("spacer") na bázi polyethylenglykolu (PEG) mezi funkčními skupinami polystyrenových kuliček a místem styku s první aminokyselinou. Poloha tohoto místa styku se může měnit podle funkce zvoleného C-zakončení. V tomto případě se používá různých pryskyřic PEG-PS.

Výchozí pryskyřice a použité aminokyseliny jako surovina jsou obchodně dostupné (PerSeptive-Biosystem, nebo Néosystem).

K syntese peptidů se používá chránicích skupin s následujícími řetězci:

Aminokyselina	Chránicí skupina
arginin	pentamethyl-2,2,4,6,7-dihydrobenzofuran-5-sulfonyl (Pbf)
asparagin, glutamin	trityl (Trt)
cystein	trityl (Trt) nebo acetamidomethyl (Acm)
serin, threonin	ether terc.-butylu (tBu)
tyrosin	
lysin, tryptofan	terc.-butyloxykarbonyl (Boc)

21.12.99

Dočasnou ochranou primární a aminoskupiny použitých aminokyselin je skupina 9-fluorenylmethyloxykarbonylová (Fmoc) Chránicí skupinu je možno odstranit 20% roztokem piperidinu v dimethylformamidu.

Ke kopulaci se používá s výhodou nadbytku diisopropylkarbodiimidu (DIPCDI) a hydroxy-1-benzotriazolu (HOB).

Po syntese se pryskyřice promyje organickými rozpouštědly (postupně dimethylformamidem a dichlormethanem) vysuší se ve vakuu, načež se zpracuje roztokem na bázi kyseliny trifluoroctové (TFA) ochlazené na teplotu 0 °C a obsahující vhodné zachycovače (scavengers). Použít lze například reakčního činidla K obsahujícího 82 % trifluoroctové kyseliny, 5 % fenolu, 5 % vody, 5 % thioanisolu a 3 % ethandithiolu.

Po titraci pryskyřice se syntetické peptidy vysrážejí a propláchnou se etherem.

Syntetické peptidy se pak čistí kapalinovou chromatografií v inverzní fázi a jejich čistota se stanoví hmotovou spektrometrií. Jako pevné fáze je možno použít například fáze Bondapak C-18. Peptidy se eluují lineárním gradientem mezi dvěma pufrovými roztoky, prvním v podstatě vodným (například vodná 0,1% TFA) a druhým spíše organickým (například směsí obsahující 60 % acetonitrilu, 39,92 % vody a 0,08 % TFA). Čisté frakce se shromáždí, zkoncentrují se ve vakuu a lyofilizují se.

K cyklizaci se vyčištěné syntetické peptidy rozpustí v roztoku octanu amonného (10 mM), hodnota pH se nastaví na 8,5 přísadou 1M amoniaku. Roztok se intenzivně míchá. Cykliza-

ce je ukončena po 18 hodinách. Hodnota pH se pak sníží na 6 přidáním kyseliny octové. Cyklizované peptidy se lyofilizují, čistí se kapalinovou chromatografií v inverzní fázi jak shora popsáno.

Imunoreaktivita peptidů podle vynálezu se hodnotí pomocí séra nemocných jedinců převážně z Kamerunu, infikovaných retroviry HIV-1 skupiny O. Různé provedené zkoušky ukázaly, že peptidy podle vynálezu samotné nebo ve spojení (peptidové prostředky) umožňují 100% detekci sér infikovaných virem HIV-1 skupiny O.

Syntetické peptidy podle vynálezu nacházejí tudíž uplatnění v imunologických testech k vypátrání infekcí způsobených retrovirem HIV-1 skupiny O. Je rovněž možno použít souboru několika syntetických peptidů obecného vzorce I. Tyto soubory, které mohou obsahovat dva nebo několik peptidů obecného vzorce I, jsou také předmětem vynálezu. Přednost se dává souborům obsahujícím peptidy č. 1 (2B) a č. 3 (4B).

Stejně je možno použít syntetických peptidů obecného vzorce I podle vynálezu ve spojení s rekombinovanými peptidy (rekombinantními proteiny) HIV-1 skupiny O, které lze získat klasickými způsoby a majícími sekvence popsané v příkladu přihlášky vynálezu číslo EP O 591 914. Také tyto sloučeniny spadají do rámce vynálezu.

Syntetických peptidů podle vynálezu je možno použít také ve spojení s jinými syntetickými nebo rekombinovanými HIV-1 (rekombinantní proteiny) HIV-2 peptidy popsanými například v následujících patentových spisech: EP O 387 914, EP O 239 425, EP O 220 273 nebo EP O 267 802.

Prostředky obsahující jeden nebo několik syntetických peptidů obecného vzorce I a několik syntetických nebo rekombinovaných HIV-1 nebo HIV-2, nacházejí uplatnění v diagnostice k vypátrání nemocných infikovaných různými retroviry HIV. Také

21.12.99

PV 1999-3575
O.S. 87677

tyto prostředky spadají do rozsahu vynálezu.

Vynález se týká také způsobů imunizačního dávkování používajících několika syntetických peptidů obecného vzorce I samotných nebo ve spojení s rekombinovanými peptidy ~~VII~~^{HIV-1} skupiny O nebo syntetických peptidů nebo rekombinovaných ~~VII~~^{HIV-1} a/nebo ~~VII-2~~^{HIV-2}.

Vynález se týká také kitů k zavádění imunitních dávek, které zahrnují peptid obecného vzorce I nebo prostředek obsahující alespoň jeden peptid obecného vzorce I.

Vynález objasňují, nijak však neomezují následující příklady praktického provedení.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Příprava sloučeniny podle vynálezu: peptid číslo 2 (3B)

LLSLWGCRGRLVCYTSVQWNET

nebo

Leu	Leu	Ser	Leu	Trp	Gly	Cys	Arg	Gly	Arg	Leu	Val	Cys	Tyr	Thr	Ser	Val	Gln	Trp	Asn
1				5					10					15				20	
Glu Thr																			

Tento peptid se syntetizuje v pevné fázi. Použitý způsob, který zavedl v roce 1963 Merifield (J.Am.Chem.Soc. 85, str. 2149 až 2154 (1963), je založen na fixování první aminokyseliny na pevném polymerním nosiči (pryskyřici) jeho kyselou skupinou a v prodloužení peptidické sekvence od první aminokyseliny, přičemž peptid zůstává během syntesy zakotven na pryskyřici.

K syntese peptidu č.2 se použije jako syntetizátoru "9050 Plus Pep Synthetizer" a jako pryskyřice Fmoc Thr (OtBu) PEG PS.

21.12.99

Jednotlivé kroky syntesy vyplývají z následující tabulky I. (ve sloupci I je uveden zbytek aminokyseliny, ve sloupci II skupina chránící aminoskupinu NH_2 , ve sloupci III skupina chránící postranní skupinu, ve sloupci IV způsob kopulace a ve sloupci V počet ekvivalentů a doba kopulace, "eq" znamená ekvivalent)

Tabulka I

I	II	III	IV	V
Glu	Fmoc	OtBu	DIPCDI/HOBt	5 eq - 30 min
Asn	Fmoc	Trt	DIPCDI/HOBt	5 eq - 30 min
Trp	Fmoc	Boc	DIPCDI/HOBt	5 eq - 30 min
Gln	Fmoc	Trt	DIPCDI/HOBt	5 eq - 30 min
Val	Fmoc		DIPCDI/HOBt	5 eq - 30 min
Ser	Fmoc	tBu	DIPCDI/HOBt	5 eq - 30 min
Thr	Fmoc	tBu	DIPCDI/HOBt	5 eq - 30 min
Tyr	Fmoc	tBu	DIPCDI/HOBt	5 eq - 30 min
Cys	Fmoc	Trt	DIPCDI/HOBt	5 eq - 30 min
Val	Fmoc		DIPCDI/HOBt	5 eq - 30 min
Leu	Fmoc		DIPCDI/HOBt	5 eq - 30 min
Arg	Fmoc	Pbf	DIPCDI/HOBt	5 eq - 30 min
Gly	Fmoc		DIPCDI/HOBt	5 eq - 30 min
Arg	Fmoc	Pbf	DIPCDI/HOBt	5 eq - 30 min
Cys	Fmoc	Trt	DIPCDI/HOBt	5 eq - 30 min
Gly	Fmoc		DIPCDI/HOBt	5 eq - 30 min
Trp	Fmoc	Boc	DIPCDI/HOBt	5 eq - 30 min
Leu	Fmoc		DIPCDI/HOBt	5 eq - 30 min
Ser	Fmoc	tBu	DIPCDI/HOBt	5 eq - 30 min
Leu	Fmoc		DIPCDI/HOBt	5 eq - 30 min
Leu	Fmoc		DIPCDI/HOBt	5 eq - 30 min

Po ukončení syntesy se pryskyřice promyje postupně dimethylformamidem a dichlormethanem a vysuší se ve vakuu.

21.12.99

Pryskyřice se pak zpracuje reakčním činidlem K (82 % tri-fluorooctové kyseliny, 5 % fenolu, 5 % vody, 5 % thioanisolu a 3 % ethandithiolu). Peptid číslo 2 (3B) se izoluje vysrážením pomocí diethyloxidu a promyje se stejným rozpouštědlem. Získá se tak 140 mg peptidu číslo 2 (3B).

Peptid číslo 2 (3B) se čistí kapalinovou chromatografií v inverzní fázi. Jako pevné fáze se použije fáze Bondapak C-18. Peptid se eluuje gradientem mezi dvěma pufrnými roztoky, prvním v podstatě vodným (například vodným 0,1% TFA) a druhým spíše organickým (například směsí obsahující 60 % acetonitrilu, 39,92 % vody a 0,08 % TFA). Čistě frakce se shromáždí, koncentrují se ve vakuu a lyofilizují se.

K cyklizaci se takto získaný vyčištěný syntetický peptid rozpustí v roztoku octanu amonného (10 mM), hodnota pH se nastaví na 8,5 přísadou 1M amoniaku. Roztok se intenzivně míchá. Cyklizace je ukončena po 18 hodinách. Hodnota pH se pak sníží na 6 přidáním kyseliny octové. Cyklizovaný peptid se lyofilizuje, čistí se kapalinovou chromatografií v inverzní fázi, jak shora popsáno.

Příprava sloučeniny podle vynálezu: peptid číslo 15 (22B)

Peptid se syntetizuje jako peptid číslo 2 (3B), avšak s použitím pryskyřice FmocPAL PEG-PS.

Jednotlivé kroky syntesy vyplývají z následující tabulky II. (ve sloupci I je uveden zbytek aminokyseliny, ve sloupci II skupina chránící aminoskupinu NH_2 , ve sloupci III skupina chránící postranní skupinu, ve sloupci IV způsob kopulace a ve sloupci V počet ekvivalentů a doba kopulace, "eq" znamená ekvivalent)

21.12.99

Tabulka II

I	II	III	IV	V
Val	Fmoc		DIPCDI/HOBt	5 eq - 45 mn
Ser	Fmoc	tBu	DIPCDI/HOBt	5 eq - 45 mn
Thr	Fmoc	tBu	DIPCDI/HOBt	5 eq - 45 mn
Tyr	Fmoc	tBu	DIPCDI/HOBt	5 eq - 45 mn
Cys	Fmoc	Trt	DIPCDI/HOBt	5 eq - 45 mn
Val	Fmoc		DIPCDI/HOBt	5 eq - 45 mn
Leu	Fmoc		DIPCDI/HOBt	5 eq - 45 mn
Arg	Fmoc	Pbf	DIPCDI/HOBt	5 eq - 45 mn
Gly	Fmoc		DIPCDI/HOBt	5 eq - 45 mn
Lys	Fmoc	Boc	DIPCDI/HOBt	5 eq - 45 mn
Cys	Fmoc	Trt	DIPCDI/HOBt	5 eq - 45 mn
Gly	Fmoc		DIPCDI/HOBt	5 eq - 45 mn
Trp	Fmoc	Boc	DIPCDI/HOBt	5 eq - 45 mn
Ser	Fmoc	tBu	DIPCDI/HOBt	5 eq - 45 mn
Asn	Fmoc	Trt	DIPCDI/HOBt	5 eq - 45 mn
Leu	Fmoc		DIPCDI/HOBt	5 eq - 45 mn
Leu	Fmoc		DIPCDI/HOBt	5 eq - 45 mn
Arg	Fmoc	Pbf	DIPCDI/HOBt	5 eq - 45 mn
Gln	Fmoc	Trt	DIPCDI/HOBt	5 eq - 45 mn
Gln	Fmoc	Trt	DIPCDI/HOBt	5 eq - 45 mn
Asn	Fmoc	Trt	DIPCDI/HOBt	5 eq - 45 mn
Leu	Fmoc		DIPCDI/HOBt	5 eq - 45 mn
Leu	Fmoc		DIPCDI/HOBt	5 eq - 45 mn
Thr	Fmoc	tBu	DIPCDI/HOBt	5 eq - 45 mn
Glu	Fmoc	OtBu	DIPCDI/HOBt	5 eq - 45 mn
Leu	Fmoc		DIPCDI/HOBt	5 eq - 45 mn
Ala	Fmoc		DIPCDI/HOBt	5 eq - 45 mn
Arg	Fmoc	Pbf	DIPCDI/HOBt	5 eq - 45 mn

Po ukončení syntesy se pryskyřice promyje dimethylformamidem, pak dichlormethanem a vysuší se ve vakuu. Pryskyřice se pak zpracuje reakčním činidlem K (82 % trifluoroctové kyseliny, 5 % fenolu, 5 % vody, 5 % thioanisolu a 3 % ethandithiolu). Peptid číslo 7 (22B) se izoluje vysrážením pomocí diethyloxidu a promyje se stejným rozpouštědlem. Získá se 140 mg peptidu číslo 15 (22B). Peptid číslo 15 (22B) se čistí kapalinovou chromatografií v inverzní fázi, pak se cyklizuje, lyofilizuje a čistí jak popsáno shora u peptidu číslo 2 (3B).

Obdobným způsobem a za použití pryskyřic a vhodných aminokyselin se připravují ostatní sloučeniny podle vynálezu.

Tabulka III udává molekulové hmotnosti určitých peptidů obecného vzorce I v necyklizované formě podle hmotové spektrometrie.

Tabulka III

Peptid číslo	Molekulová hmotnost (daltony)
1 (2B)	2512
2 (3B)	2583
3 (4B)	2528
4 (5B)	2586
5 (6B)	2527
9 (12B)	1772
10 (14B)	1799
11 (18B)	3752
12 (19B)	3778
13 (20B)	3780
14 (21B)	2538
15 (22B)	3222
16 (23B)	1941

Příklad 2

Vyhodnocení imunoreaktivity peptidů podle vynálezu imunoenzymatickým testem: test číslo 1

Použitými séry ESS, DUR, VAU a HAD jsou séra nemocných Francouzů infikovaných retrovirem HIV-1 skupiny O. Ostatní vzorky sér nemocných infikovaných retrovirem HIV-1 skupiny O se získaly ze střediska Centre Pasteur de Yaoundé v Kamerunu a byly serotypovány skupinou O podle sérologického algoritmu popsaného v literatuře (AIDS 11, str. 445 až 453, 1977). Negativní séra HIV (n=48) byla získána od zdravých dobrovolníků.

Použité peptidy se rozpustí ve vodě v koncentraci 1 mg/ml (matečný roztok). K senzibilizaci pevné fáze (povlaku) se do každého důlku mikrotitrační destičky Microtiter™ (NUNC) vnese 110 µl roztoku vždy 2 µg/ml každého peptidu (získaného zředěním mateřského roztoku roztokem uhličitanového pufru (0,1M). Po inkubaci přes noc při teplotě okolí se mikrodestičky promyjí napřed puftrem Tris NaCl pH 7,4 obsahujícím 0,1 % Tweenu^R 20 a 0,001 % merthiolátu sodného, nasytí se roztokem PBS obsahujícím 0,5 % Regilaitu™ (sušené odstředěné mléko). Po odpaření nasyceného roztoku, se destičky udržují ohříváním na teplotě 50 °C po dobu 10 minut. Vzorky sér se zředí na 1/5 roztokem odstředěného mléka (citrátový pufr s přísadou 0,01 % fenolové červěně, 0,25 % chloroformu a 0,25 % Kathonu^R) vneseného do důlků destiček a podrobí se inkubaci 30 minut při teplotě 40 °C.

Po promytí roztokem pufru Tris NaCl pH 7,4, obsahujícím 0,1 % Tweenu^R 20 a 0,001 % merthiolátu sodného, se přidá 100 µl roztoku konjugovaných kozích protilátek IgG a lidských IgM za označení peroxidázou křenu, obsahujících jako konzervační látku 0,01 % merthiolátu sodného, v roztoku citrátového pufru s přísadou 30 % glycerolu a 25 % normálního telecího zárodeč-

21.12.99

PV 1999-3575

Č.J. 87 677

ného séra do každého důlku destiček, načež se destičky inkubují 30 minut při 40 °C. Po promytí roztokem pufru Tris NaCl pH 7,4, obsahujícím 0,1 % Tweenu^R 20 a 0,001 % merthiolátu sodného, se získá vybarvení přísadou do každého důlku 100 µl O-fenylendiaminu v roztoku peroxidu vodíku. Mikrodestičky se pak inkubují 30 minut ve tmě při teplotě okolí. Barevná reakce se ukončí přísadou 100 µl 4N kyseliny sírové. Absorbance (A) se stanoví při 490 a 620 nm.

Relativní absorbance (A₄₉₀-A₆₂₀) odečtená v každém důlku je úměrná imunoreaktivitě každého peptidu a indikuje schopnost každého peptidu reagovat se zkoušeným biologickým vzorkem. Prahová hodnota (cut-off) se stanoví jako absorbance rovná 0,15. Odpovídá průměru hodnot negativních (n=48) plus 12 odchylných typů. Reaktivita peptidů podle vynálezu (peptidu číslo 3 (4B), peptidu číslo 2 (3B) a peptidu číslo 1 (2B) všech v cyklizované formě) se porovnává s reaktivitou dvou syntetických peptidů majících jako sekvenci část sekvence přírodní obálky (env) izolátu VAU (retrovirus ^{HIV-1} ~~VII~~ skupiny O) a nesoucí imunodominantní epitop gp41.

Tyto dva peptidy mají následující sekvenci:

Leu	Leu	Asn	Leu	Trp	Gly	Cys	Lys	Asn	Arg	Ala	Ile	Cys	Tyr	Thr	Ser	Val	Lys	Trp	Asn
1			5						10					15					20
Lys	Thr																		
	22																		

VAU 35 AA

Arg	Leu	Leu	Ala	Leu	Glu	Thr	Phe	Ile	Glu	Glu	Asn	Glu	Leu	Leu	Asn	Leu	Trp	Gly	Cys
1				5							10				15				20
Lys	Asn	Arg	Ala	Ile	Cys	Tyr	Thr	Ser	Val	Lys	Trp	Asn	Lys	Thr					
				25							30				35				

Peptidy pro tuto studii se užívají vždy v cyklické formě.

21.12.99

Výsledky jsou uvedeny v tabulce IV. (N° znamená číslo vzorku.)

Tabulka IV

SÉRUM	ABSORBANCE				
	PEPTID . N° 3 (4B)	PEPTID N° 2 (3B)	PEPTID . N° 1 (2B)	VAU 22 AA	VAU 35 AA
ESS*	>*	>	2,494	>	>
DUR*	>	>	>	0,118	0,872
HAD	>	0,518	0,041	0,789	0,871
VAU*	1,342	>	>	>	>
3935	>	0,893	0,307	0,138	0,227
6891	>	0,614	0,062	0,359	0,496
6512*	0,746	0,785	>	0,120	0,174
1105*	1,421	1,031	>	0,099	0,129
4021*	0,430	0,119	>	0,050	1,957
5969*	>	0,282	>	2,491	>
2700	>	0,274	>	>	>
5453	0,555	0,081	>	1,267	1,482
5931	>	>	>	0,202	2,225
3136	>	0,992	0,302	>	>
3653	1,352	>	0,044	1,441	1,322
2352	>	>	0,205	>	>
3016	>	>	0,243	>	>
3302	>	>	0,386	>	>
2294	>	>	0,447	>	>
3771	>	>	0,544	>	>
1581	>	>	>	1,112	0,894
5373	>	>	>	1,359	0,856
7443	>	>	>	0,920	0,574
3637	>	>	>	0,779	1,647
6295*	1,718	1,063	>	0,972	>
6689*	0,710	>	>	>	>
1754	>	>	>	1,263	1,948
4489*	>	>	>	1,318	1,718
4364	>	>	1,382	>	>
3884*	>	>	1,839	>	>
3529	>	>	1,803	>	>
3482	2,402	>	1,473	>	>
1702	>	>	1,162	>	>
6487	>	1,017	2,687	2,889	2,891
5164	>	>	>	>	>
5766*	>	>	>	>	>
3945	>	>	>	>	>

21.12.99

SÉRUM	ABSORBANCE				
	PEPTID. N° 3 (4B)	PEPTIDE N° 2 (3B)	PEPTID N° 1 (2B)	VAU-22 AA	VAU 35 AA
4434	>	>	>	2,273	>
4288*	>	>	2,802	2,337	N.T.***
6782	>	2,091	2,462	2,190	2,214
2313	>	>	>	>	>
2312	>	>	>	>	>
1062	>	>	>	>	>
402	>	>	>	>	>
134	>	>	>	>	>
7120	>	>	>	>	>
7212	>	>	>	>	>
6976*	>	>	>	>	>
3600*	>	>	2,743	>	>
3236	>	>	>	>	>
3235	>	>	>	>	>
2551	>	>	>	>	>
5270*	>	>	>	>	>
5210	>	>	>	>	>
5149*	>	>	>	>	>
4477	>	>	>	2,511	>
3891	>	>	2,780	>	>
3627*	>	>	2,910	>	>
7258*	>	>	2,477	>	>
7007	2,136	2,334	>	>	2,151
6697	>	>	>	>	>
6998	>	>	>	>	>
6627	>	>	>	>	>
6198*	>	>	>	>	>
6165	>	>	2,714	>	>
7439	>	>	>	>	>
7297*	>	>	>	>	>
6111	>	>	>	>	>
625	>	>	>	>	2,885

* sérotyp/genotyp

** > = signál převyšující kapacitu čtení spektrometru

*** nezkoušeno

Z tabulky IV je zřejmé, že peptid číslo 3 (4B) představuje nejlepší užitkové vlastnosti se zřetelem na užitkové vlastnosti ostatních peptidů. Tento peptid umožňuje nejlepší rozlišení sér nemocných lidí infikovaných retrovirem HIV-1 skupiny O oproti dvěma peptidům majícím část sekvence izolátu VAU odpovídajícího imunodominantnímu epitopu gp41. Kromě toho jsou peptidy číslo 2 (3B) a číslo 1 (2B) podle vynálezu více imunoreaktivní než peptid VAU 22 AA, který má stejný počet aminokyselin.

Příklad 3

Vyhodnocení imunoenzymatických testů imunoreaktivity peptidů podle vynálezu: test číslo 2

Vzorky sér nemocných lidí infikovaných retrovirem HIV-1 skupiny O byly získány ze střediska Centre Pasteur de Yaoundé v Kamerunu a byly serotypovány skupinou O podle sérologického algoritmu popsaného v AIDS 11, str. 445 až 453 (1977)). Jeden genotypovaný vzorek (Maryland) pocházel ze Spojených států. Vzorky byly předběžně zředěny v negativním lidském séru na ředění uvedená v tabulce V k získání postačujícího objemu k testům imunoreaktivity.

Použité syntetické peptidy se rozpustí ve vodě na koncentraci 1 mg/ml (mateřský roztok). K etapě sensibilizace pevné fáze ("coating") se postupuje stejně jako podle příkladu 2.

Vzorky sér se zředí na 1/5 roztokem odstředěného mléka (citrátový pufr s přísadou 0,01 % fenolové červěně, 0,25 % chloroformu a 0,25 % Kathonu^R) vneseného do důlků destiček a podrobí se inkubaci po dobu 30 minut při teplotě 40 °C.

Po promytí roztokem pufru Tris NaCl pH 7,4, obsahujícím 0,1 % Tweenu^R 20 a 0,001 % merthiolátu sodného, se přidá 100

21.12.99

PV 1999-3575
 TS 87677

μ l roztoku konjugovaných kozích protilátek IgG a lidských IgM za označení peroxidázou křenu, obsahující jako konzervační látku 0,01 % merthiolátu sodného, v roztoku citrátového pufru s přísadou 30 % glycerolu a 25% normálního telecího zárodečného séra do každého důlku destiček, načež se destičky inkubují 30 minut při teplotě 40 °C.

Po promytí roztokem pufru Tris NaCl pH 7,4, obsahujícím 0,1 % Tweenu^R 20 a 0,001 % merthiolátu sodného, se získá vybarvení jako podle příkladu 2.

Relativní absorbance (A490-A620) odečtená v každém důlku je úměrná imunoreaktivitě každého peptidu a indikuje schopnost každého peptidu reagovat se zkoušeným biologickým vzorkem.

Reaktivita peptidů podle vynálezu (peptidu číslo 10 (14B), peptidu číslo 12 (19B), peptidu číslo 14 (21B) a peptidu číslo 16 (23B) všech v cyklizované formě) se porovnává s reaktivitou tří homologů syntetických peptidů majících jako sekvenci část sekvence přírodní obálky (env) retroviru ~~VII~~^{HIV-1} skupiny O. Těmito peptidy jsou dva peptidy odvozené z izolátu VAU - peptid VAU 22 AA a peptid VAU 35 AA a peptid MVP 5180 (označený "MVP 5180" v tabulce V). Peptidy VAU 22 AA a VAU 35 AA, (jejichž struktura je vyznačena v příkladu 2) a peptid MVP 5180 odpovídají imunodominantnímu epitopu gp41.

Všechny tyto peptidy jsou použity v cyklizované formě. Sekvence peptidu MVP 5180 je následující:

MVP 5180

Arg	Leu	Gln	Ala	Leu	Glu	Thr	Leu	Ile	Gln	Asn	Gln	Gln	Arg	Leu	Asn	Leu	Trp	Gly	Cys
1				5				10					15				20		
Lys	Gly	Lys	Leu	Ile	Cys	Tyr	Thr	Ser	Val	Lys	Trp	Asn	Thr	Ser					
				25				30					35						

Výsledky této studie jsou uvedeny v tabulce V. (N° znamená číslo vzorku.)

Tabulka V

SÉRUM	PEPTID *								
	N° 10	N° 11	N° 12	N° 14	N° 15	N° 16	MVP 5180	VAU 35 AA	VAU 22 AA
	ABSORBANCE (DO)								
4280 1/50	0,022	0,686	0,201	0,286	0,689	0,033	0,382	0,013	0,021
NGO 1/50	0,067	0,335	0,193	0,157	0,315	0,110	0,184	0,055	0,040
NJEM 1/100	0,032	0,811	0,391	0,277	0,939	0,025	0,146	0,159	0,024
MBASSI 1/100	1,217	1,150	0,747	2,134	2,010	2,683	0,248	0,120	0,257
WANG 1/50	0,698	0,234	0,124	2,397	2,680	1,290	0,075	0,025	0,041
258 OUDI 1/100	0,587	0,373	0,226	0,764	1,184	1,692	0,116	0,058	0,100
DO15 1/100	1,613	0,859	1,286	3,357	3,693	3,038	0,673	0,036	0,075
DJOU 1/100	1,268	0,482	0,419	1,998	2,088	2,166	0,203	0,022	0,042
3600 1/100	0,482	0,360	0,249	0,716	0,801	0,933	0,206	0,025	0,058
3613 1/400	1,108	0,837	0,773	1,508	1,627	1,679	0,478	0,250	0,396
6111 1/100	0,596	0,348	0,202	0,850	1,207	1,009	0,226	0,087	0,180
625 1/50	0,838	0,338	0,264	2,045	2,122	1,791	0,202	0,069	0,165
Maryland 1/400	0,524	0,370	0,285	0,734	0,844	1,229	0,241	0,054	0,168
3653 1/10	0,347	0,337	0,247	0,072	0,380	0,406	0,401	0,021	0,310

* Pevná fáze: peptid 2 µg/ml

U každého testovaného peptidu se vzorky dělí do čtyř tříd (a,b,c,d) odpovídajících různým hodnotám relativní absorbance odečtené při vlnových délkách A492 a A620:

- v případě a: $DO < 0,100$
- v případě b: $0,100 < DO < 0,500$
- v případě c: $0,500 < DO < 1,000$
- v případě d: $DO > 1,000$

což umožňuje hodnotit imunoaktivitu peptidů. Nejvíce imunoreaktivními jsou peptidy, jejichž největší počet vzorků je ve třídách odpovídajících nejvyšší absorbanci. Výsledky obsahuje tabulka VI (N° znamená číslo vzorku.)

Tabulka VI

CLASSE	PEPTIDES *								
	N° 10	N° 11	N° 12	N° 14	N° 15	N° 16	MVP 5180	VAU 35 AA	VAU 22 AA
	Nombre d'échantillons								
a	3	0	0	1	0	2	1	11	7
b	2	9	11	3	2	2	12	3	7
c	5	4	2	4	4	1	1	0	0
d	4	1	1	6	8	9	0	0	0

Pevná fáze*: peptid 2 µg/ml

Výsledky ukazují, že všechny testované peptidy podle vynálezu vykazují lepší imunoreaktivní účinnost než peptidy odpovídající dosavadnímu stavu techniky, které pocházejí z přírodních izolantů (MVP 5180, VAU). Jako nejvíce imunoreaktivní se jeví peptidy podle vynálezu číslo 15 (22B), číslo 14 (21B) a číslo 16 (23B).

Příklad 4

Vyhodnocení imunoreaktivity prostředků obsahujících peptidy podle vynálezu imunoenzymatickými testy

Při této studii se postupuje podle stejné jako podle příkladu 2 a je použito stejných sér. Použité mikrodestičky jsou sensibilizovány jednak cyklizovaným peptidem číslo 1 (2B), cyklizovaným peptidem číslo 3 (4B), jednak prostředkem obsahujícím oba peptidy (1:1 p/p). Do každého důlku se vnese 100 µl roztoku obsahujícího 2 µg/ml peptidu číslo 1 (2B) nebo 100 µl

21.12.99

roztoku obsahujícího 2 $\mu\text{g/ml}$ peptidu číslo 3 (4B) nebo 100 μl roztoku obsahujícího 1 $\mu\text{g/ml}$ peptidu číslo 1 (2B) a 1 $\mu\text{g/ml}$ peptidu číslo 3 (4B).

Výsledky jsou v tabulce VII. (N° znamená číslo vzorku.)

Tabulka VII

SÉRUM	ABSORBANCE		
	PEPTID N° 1 (2B) (2 $\mu\text{g/ml}$)	PEPTID N° 3 (4B) (2 $\mu\text{g/ml}$)	PEPTID N° 1 (2B) (1 $\mu\text{g/ml}$) + PEPTID N° 3 (4B) (1 $\mu\text{g/ml}$)
3529	1,803	>*	>
1105	>	1,421	>
3891	2,780	>	>
3235	>	>	>
2700	>	>	>
5931	>	>	>
3935	0,307	>	>
7443	>	>	>
1062	>	>	>
1754	>	>	>
3136	0,302	>	>
6891	0,062	>	>
5149	>	>	>
5270	>	>	>
2551	>	>	>
3600	2,743	>	>
6976	>	>	>
4489	>	>	>
6165	2,714	>	>
6198	>	>	>
6627	>	>	>
6998	>	>	>
6697	>	>	>
7258	2,477	>	>
3627	2,910	>	>
4477	>	>	>
3771	0,544	>	>
1702	1,016	>	>
2294	0,447	>	>
2352	0,205	>	>
3016	0,243	>	>
3302	0,386	>	>

21.12.99

3482	1,473	>	>
3653	0,044	1,322	>
4364	1,382	>	1,105
3637	>	>	>
4288	2,802	>	>
5969	>	>	>
258	>	>	>
6111	>	>	>
625	>	>	>
6853	>	2,769	>
3136	0,302	>	>
6689	>	0,710	>
6295	>	1,718	>
4021	>	0,430	>
3884	1,839	>	2,381
6512	>	0,746	>
6487	2,687	>	>
ESS	2,494	>	>
HAD	0,041	>	>
DUR	>	>	>

* > = signál převyšující kapacitu čtení spektrometru

Výsledky uvedené v tabulce VII ukazují, že je-li v diagnostice použito prostředků s peptidy podle vynálezu, docílí se detekce všech sér nemocných infikovaných retrovirem VIH-1 skupiny 0.

Val Gln Trp Asn Glu Thr
20

21.12.99

(2) Informace o sekvenci SEQ ID č. 2:

(i) Charakteristika sekvence:

(A) Délka: 22 aminokyselin

(B) Typ: aminokyselina

(ii) Typ molekuly: peptid

(xi) Popis sekvence: SEQ ID č.2

Leu Leu Ser Leu Trp Gly Cys Arg Gly Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser
1 5 10 15

Val Gln Trp Asn Glu Thr
20

(2) Informace o sekvenci SEQ ID č. 3:

(i) Charakteristika sekvence:

(A) Délka: 22 aminokyselin

(B) Typ: aminokyselina

(ii) Typ molekuly: peptid

(xi) Popis sekvence: SEQ ID č.3

Leu Leu Ser Ser Trp Gly Cys Lys Gly Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser
1 5 10 15

Val Gln Trp Asn Glu Thr
20

(2) Informace o sekvenci SEQ ID č. 4:

(i) Charakteristika sekvence:

(A) Délka: 22 aminokyselin

(B) Typ: aminokyselina

(ii) Typ molekuly: peptid

(xi) Popis sekvence: SEQ ID č.4

21.12.99

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 4:

Leu Leu Ser Ser Trp Gly Cys Lys Gly Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser
 1 5 10 15
 Val Gln Trp Asn Ser Thr
 20

(2) Informace o sekvenci SEQ ID č. 5:

(i) Charakteristika sekvence:

(A) Délka: 22 aminokyselin

(B) Typ: aminokyselina

(ii) Typ molekuly: peptid

(xi) Popis sekvence: SEQ ID č.5

Leu Leu Gln Ser Trp Gly Cys Lys Gly Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser
 1 5 10 15
 Val Gln Trp Asn Ser Thr

(2) Informace o sekvenci SEQ ID č. 6:

(i) Charakteristika sekvence:

(A) Délka: 22 aminokyselin

(B) Typ: aminokyselina

(ii) Typ molekuly: peptid

(xi) Popis sekvence: SEQ ID č.6

Leu Leu Asn Ser Trp Gly Cys Arg Gly Lys Ala Val Cys Tyr Thr Ser
 1 5 10 15
 Val Gln Trp Asn Glu Thr
 20

(2) Informace o sekvenci SEQ ID č. 7:

(i) Charakteristika sekvence:

(A) Délka: 22 aminokyselin

21.12.99

(B) Typ: aminokyselina

(ii) Typ molekuly: peptid

(xi) Popis sekvence: SEQ ID č.7

Leu Leu Ser Leu Trp Gly Cys Arg Gly Arg Ala Val Cys Tyr Thr Ser
 1 5 10 15
 Val Gln Trp Asn Glu Thr
 20

(2) Informace o sekvenci SEQ ID č. 8:

(i) Charakteristika sekvence:

(A) Délka: 22 aminokyselin

(B) Typ: aminokyselina

(ii) Typ molekuly: peptid

(xi) Popis sekvence: SEQ ID č.8

Leu Leu Ser Ser Trp Gly Cys Arg Gly Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser
 1 5 10 15
 Val Gln Trp Asn Glu Thr
 20

(2) Informace o sekvenci SEQ ID č. 9:

(i) Charakteristika sekvence:

(A) Délka: 22 aminokyselin

(B) Typ: aminokyselina

(ii) Typ molekuly: peptid

(xi) Popis sekvence: SEQ ID č.9

Leu Leu Ser Ser Trp Gly Cys Lys Gly Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser
 1 5 10 15

21.12.99

(2) Informace o sekvenci SEQ ID č. 10:

(i) Charakteristika sekvence:

(A) Délka: 16 aminokyselin

(B) Typ: aminokyselina

(ii) Typ molekuly: peptid

(xi) Popis sekvence: SEQ ID č.10

Leu	Leu	Asn	Ser	Trp	Gly	Cys	Lys	Gly	Arg	Leu	Val	Cys	Tyr	Thr	Ser
1				5					10					15	

(2) Informace o sekvenci SEQ ID č. 11:

(i) Charakteristika sekvence:

(A) Délka: 32 aminokyselin

(B) Typ: aminokyselina

(ii) Typ molekuly: peptid

(xi) Popis sekvence: SEQ ID č.11

Ala	Leu	Glu	Thr	Leu	Leu	Gln	Asn	Gln	Gln	Leu	Leu	Asn	Ser	Trp	Gly
1				5					10					15	

Cys	Arg	Gly	Arg	Leu	Val	Cys	Tyr	Thr	Ser	Val	Arg	Trp	Asn	Glu	Thr
			20					25					30		

(2) Informace o sekvenci SEQ ID č. 12:

(i) Charakteristika sekvence:

(A) Délka: 32 aminokyselin

(B) Typ: aminokyseliny

(ii) Typ molekuly: peptid

21.12.99

(xi) Popis sekvence: SEQ ID č.12

Ala	Leu	Glu	Thr	Leu	Leu	Gln	Asn	Gln	Gln	Leu	Leu	Asn	Ile	Trp	Gly
1				5					10					15	
Cys	Arg	Gly	Arg	Leu	Val	Cys	Tyr	Thr	Ser	Val	Arg	Trp	Asn	Glu	Thr
			20					25					30		

(2) Informace o sekvenci SEQ ID č. 13:

(i) Charakteristika sekvence:

(A) Délka: 32 aminokyselin

(B) Typ: aminokyseliny

(ii) Typ molekuly: peptid

(xi) Popis sekvence: SEQ ID č.13

Ala	Leu	Glu	Thr	Leu	Leu	Gln	Asn	Gln	Gln	Leu	Leu	Asp	Leu	Trp	Gly
1				5					10					15	
Cys	Arg	Gly	Arg	Leu	Val	Cys	Tyr	Thr	Ser	Val	Arg	Trp	Asn	Glu	Thr
			20					25					30		

(2) Informace o sekvenci SEQ ID č. 14:

(i) Charakteristika sekvence:

(A) Délka: 22 aminokyselin

(B) Typ: aminokyseliny

(ii) Typ molekuly: peptid

(xi) Popis sekvence: SEQ ID č.14

Leu	Asn	Gln	Gln	Arg	Leu	Leu	Asn	Ser	Trp	Gly	Cys	Lys	Gly	Arg	Leu
1				5					10					15	
Val	Cys	Tyr	Thr	Ser	Val										
			20												

(2) Informace o sekvenci SEQ ID č. 15:

21.12.99

(i) Charakteristika sekvence:

(A) Délka: 28 aminokyselin

(B) Typ: aminokyseliny

(ii) Typ molekuly: peptid

(xi) Popis sekvence: SEQ ID č.15

Arg Ala Leu Glu Thr Leu Leu Asn Gln Gln Arg Leu Leu Asn Ser Trp
1 5 10 15

Gly Cys Lys Gly Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser Val
20 25

(2) Informace o sekvenci SEQ ID č. 16:

(i) Charakteristika sekvence:

(A) Délka: 17 aminokyselin

(B) Typ: aminokyseliny

(ii) Typ molekuly: peptid

(xi) Popis sekvence: SEQ ID č.16

Arg Leu Asn Ser Trp Gly Cys Lys Gly Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser
1 5 10 15

Val

Průmyslová využitelnost

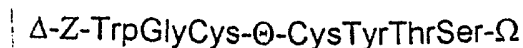
Syntetické peptidy pro výrobu kitů pro biologické testy k detekci infekcí způsobených viry VIH 1 skupiny O.

PETR KALENSKÝ
ATTORNEY AT LAW

120 00 Praha 2, Ládvě 2
Česká republika

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Syntetický peptid monomerní se 13 až 33 aminokyselinami nebo dimerní se 26 až 66 aminokyselinami, lineární nebo cyklický s intercysteinovými sírovými můstky obecného vzorce I



(I)

kde znamená

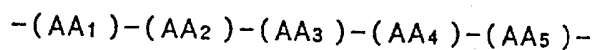
delta skupinu biotinylovou, biocytinylovou, atom vodíku, skupinu acetylovou (CH_3CO)-, alifatický řetězec, obsahující popřípadě jednu nebo dvě skupiny thiolové, aldehydové nebo aminoskupiny, alifatický řetězec, kterým je s výhodou řetězec alkylový s 1 až 6 atomy uhlíku, nebo řetězec alkenylový se 2 až 6 atomy uhlíku nebo řetězec aminoalkylkarbonylový se 2 až 6 atomy uhlíku,

Z znamená peptidovou sekvenci obecného vzorce II až X

- E₁-Ser-E₂- (II)
- Ser-E₂- (III)
- E₁-Ser- (IV)
- E₁-Gln-E₂- (V)
- Gln-E₂- (VI)
- E₁-Gln- (VII)
- E₁-Asn-E₂- (VIII)
- Asn-E₂- (IX)
- E₁-Asn- (X)

kde

-E₁ znamená peptidovou sekvenci 0 až 9 aminokyselin,
 -E₂ znamená peptidovou sekvenci 0 až 5 aminokyselin,
 Θ znamená peptidovou sekvenci obecného vzorce XI:



(XI)

kde znamená

21.12.99

- (AA₁) lysinový, argininový nebo ornithinový zbytek,
- (AA₂) glycinový nebo asparaginový zbytek
- (AA₃) lysinový, argininový nebo ornithinový zbytek
- (AA₄) leucinový, alaninový, isoleucinový nebo glutaminový zbytek
- (AA₅) isoleucinový, valinový, leucinový, threoninový, norleucinový nebo norvalinový zbytek,

za předpokladu, že (AA₁), (AA₂), (AA₃), (AA₄) a (AA₅) netvoří nikdy seskupení peptidových sekvencí -Lys Gly Lys Leu Ile a Lys Gly Lys Leu Val-,

- Ω vázaný na skupinu -CO- serinu znamená
- hydroxylovou skupinu (-OH) nebo aminoskupinu (-NH₂),
- alkoxylovou skupinu s 1 až 6 atomy uhlíku,
- peptidovou skupinu obecného vzorce XII



kde Σ znamená sekvenci obecného vzorce XIII nebo obecného vzorce XIV



kde znamená

(AA₆) aminokyselinu jinou než lysin,

(AA₇) aminokyselinu,

(AA₈) serinový nebo threoninový zbytek

a Ψ fixovaný na zbytek -CO- volné aminokyseliny AA₈ znamená skupinu OH, NH₂ nebo alkoxykupinu s 1 až 6 atomy uhlíku,

- peptidovou sekvenci obecného vzorce XV



kde Ψ fixovaný na zbytek -CO- valinu má stejný význam jako u obecného vzorce XII,
-nebo jednu z peptidových sekvencí obecného vzorce XVI až XVIII

-Z-TrpGlyCys-Θ-CysTyrThrSer-Ψ	(XVI)
Val-Σ-Z-TrpGlyCys-Θ-CysTyrThrSerVal-Σ-Ψ	(XVII)
Val-Z-TrpGlyCys-Θ-CysTyrThrSerVal-Ψ	(XVIII)

kde Z a Θ mají shora u obecného vzorce I uvedený význam
a Σ má význam uvedený u obecného vzorce XII
a Ψ fixovaný na zbytek -CO- serinu, na zbytek -CO- aminokyseliny AA₅ nebo na zbytek -CO- valinu má stejný význam jako u obecného vzorce XII.

2. Syntetický peptid podle nároku 1, obecného vzorce I, kde znamená (AA₅) valinový, leucinový, threoninový zbytek a když Ω znamená peptidovou sekvenci obecného vzorce XII nebo XIV, znamená (AA₆) buď glutaminový nebo argininový zbytek.

3. Syntetický peptid podle nároku 1, obecného vzorce I, kde znamená

- delta biotinylovou skupinu, atom vodíku nebo alifatický řetězec, který může obsahovat jednu nebo dvě thiolové, aldehydové nebo aminové skupiny, přičemž alifatický řetězec je s výhodou alkylový s 1 až 6 atomy uhlíku, nebo aminoalkyl-karbonylový se 2 až 6 atomy uhlíku,
- Z peptidovou sekvenci obecného vzorce II nebo V, kde znamená peptidovou sekvenci se dvěma aminokyselinami a aminokyselinu nebo sekvenci obecného vzorce IV, kde znamená tři aminokyseliny, nebo peptidovou sekvenci obecného vzorce VIII, kde znamená peptidovou sekvenci devíti, osmi nebo tří aminokyselin a peptidickou sekvenci pěti aminokyselin,
- Θ peptidovou sekvenci vzorce
 - Lys Gly Arg Leu Val-,
 - Arg Gly Lys Ala Val-,
 - Arg Gly Arg Leu Val-, nebo
 - Arg Gly Arg Ala Val- a
- Ω hydroxylovou skupinu, peptidovou sekvenci XV nebo jednu

21.12.99

z následujících sekvencí, které odpovídají peptidové sekvenci vzorce XII

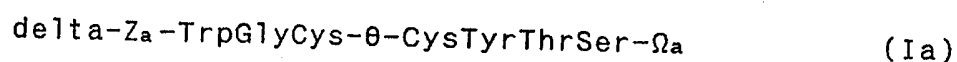
- Val₁- Val Arg Trp Asn Glu Thr-Ψ₁,
- Val₁- Val Gln Trp Asn Glu Thr-Ψ₁ nebo
- Val₁- Val Gln Trp Asn Ser Thr-Ψ₁.

4. Syntetický peptid podle nároku 1 až 3, obecného vzorce I kde znamená

Z peptidovou sekvenci vzorce

- Leu Leu Ser Ser-
- Leu Leu Asn Ser-
- Leu Leu Dln Ser-
- Arg Leu Asn Ser-
- Ala Leu Glu Thr Leu Leu Gln Asn Gln Gln Leu Leu Asn Ser-
- Ala Leu Glu Thr Leu Leu Gln Asn Gln Gln Leu Leu Asn Leu-
- Ala Leu Glu Thr Leu Leu Gln Asn Gln Gln Leu Leu Asn Ile-
- Leu Asn Gln Gln Arg Leu Asn Ser- nebo
- Arg Ala Leu Glu Thr Leu Leu Asn Gln Gln Arg Leu Leu Asn Ser-.

5. Syntetický peptid podle nároku 1 s 20 až 50 aminokyselinami obecnému vzorce Ia



kde znamená

Za skupinu vzorce IIa až Xa:

- Ξ_{1a}-Ser-Ξ_{2a} (IIa)
- Ser-Ξ_{2a} (IIIa)
- Ξ_{1a}-Ser (IVa)
- Ξ_{1a}-Gln-Ξ_{2a} (Va)
- Gln-Ξ_{2a} (VIa)
- Ξ_{1a}-Gln- (VIIa)
- Ξ_{1a}-Asn-Ξ_{2a} (VIIIa)
- Asn-Ξ_{2a} (IXa)
- Ξ_{1a}-Asn (Xa)

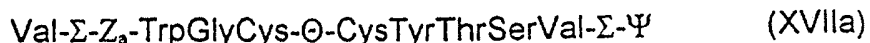
21.12.99

kde znamená

Ξ_{1a} peptidovou sekvencí jedné až pěti aminokyselin

Ξ_{2a} jednu aminokyselinu

Ω_a peptidovou sekvencí obecného vzorce XII, definovanou u obecného vzorce I nebo peptidovou sekvencí obecného vzorce XVIIa



kde Z_a má význam uvedený u obecného vzorce Ia

a delta, θ , Σ a Ψ mají stejný význam jako u obecného vzorce I.

6. Syntetický peptid podle nároku 1 až 5 mající jednu z následujících sekvencí

Sekvence č. 1

-LLSLWGCRGKAVCYTSVQWNET-

nebo

-Leu	Leu	Ser	Leu	Trp	Gly	Cys	Arg	Gly	Lys	Ala	Val	Cys	Tyr	Thr	Ser	Val	Gln	Trp	Asn
1			5					10					15					20	
Glu Thr-																			
22																			

Sekvence č. 2

-LLSLWGCRGRLVCYTSVQWNET-

nebo

-Leu	Leu	Ser	Leu	Trp	Gly	Cys	Arg	Gly	Arg	Leu	Val	Cys	Tyr	Thr	Ser	Val	Gln	Trp	Asn
1			5					10					15					20	
Glu Thr-																			
22																			

Sekvence č. 3

-LLSSWGCKGRLVCYTSVQWNET-

nebo

-Leu	Leu	Ser	Ser	Trp	Gly	Cys	Lys	Gly	Arg	Leu	Val	Cys	Tyr	Thr	Ser	Val	Gln	Trp	Asn
1			5					10					15					20	
Glu Thr-																			
22																			

21.12.99

Sekvence č. 4

-LLSSWGCKGRLVCYTSVQWNST-

nebo

-Leu Leu Ser Ser Trp Gly Cys Lys Gly Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser Val Gln Trp Asn

1 5 10 15 20
Ser Thr-
22

Sekvence č. 5

-LLQSWGCKGRLVCYTSVQWNST-

nebo

-Leu Leu Gln Ser Trp Gly Cys Lys Gly Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser Val Gln Trp Asn

1 5 10 15 20
Ser Thr-
22

Sekvence č. 6

-LLNSWGCRGKAVCYTSVQWNET-

nebo

-Leu Leu Asn Ser Trp Gly Cys Arg Gly Lys Ala Val Cys Tyr Thr Ser Val Gln Trp Asn

1 5 10 15 20
Glu Thr-
22

Sekvence č. 7

-LLSLWGCRGRAVCYTSVQWNET-

nebo

-Leu Leu Ser Leu Trp Gly Cys Arg Gly Arg Ala Val Cys Tyr Thr Ser Val Gln Trp Asn

1 5 10 15 20
Glu Thr-
22

Sekvence č. 8

-LLSSWGCRGRLVCYTSVQWNET-

nebo

-Leu Leu Ser Ser Trp Gly Cys Arg Gly Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser Val Gln Trp Asn

1 5 10 15 20
Glu Thr-
22

21.12.99

Sekvence č. 9

-LLSSWGCKGRLVCYTS-
nebo

-Leu Leu Ser Ser Trp Gly Cys Lys Gly Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser-
1 5 10 15

Sekvence č. 10

-LLNSWGCKGRLVCYTS-
nebo

-Leu Leu Asn Ser Trp Gly Cys Lys Gly Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser-
1 5 10 15

Sekvence č. 11

-ALETLLQNQQLLNSWGCRGRLVCYTSVRWNET-
nebo

-Ala Leu Glu Thr Leu Leu Gln Asn Gln Gln Leu Leu Asn Ser Trp Gly Cys Arg Gly
1 5 10 15
Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser Val Arg Trp Asn Glu Thr-
20 25 30

Sekvence č. 12

-ALETLLQNQQLLNIWGCRGRLVCYTSVRWNET-
nebo

-Ala Leu Glu Thr Leu Leu Gln Asn Gln Gln Leu Leu Asn Ile Trp Gly Cys Arg Gly
1 5 10 15
Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser Val Arg Trp Asn Glu Thr-
20 25 30

Sekvence č. 13

-ALETLLQNQQLLDLWGCRGRLVCYTSVRWNET-
nebo

-Ala Leu Glu Thr Leu Leu Gln Asn Gln Gln Leu Leu Asp Leu Trp Gly Cys Arg Gly
1 5 10 15
Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser Val Arg Trp Asn Glu Thr-
20 25 30

Sekvence č. 14

-LNQQRLLNSWGCKGRLVCYTSV-
nebo

21.12.99

-Leu Asn Gln Gln Arg Leu Leu Asn Ser Trp Gly Cys Lys Gly Arg Leu Val Cys Tyr
 1 5 10 15
 Thr Ser Val-
 20

Sekvence č. 15

-RALETLLNQQRLLNSWGCKGRLVCYTSV-

nebo

- Arg Ala Leu Glu Thr Leu Leu Asn Gln Gln Arg Leu Leu Asn Ser Trp Gly Cys
 1 5 10 15
 Lys Gly Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser Val-
 20 25

Sekvence č. 16

-RLNSWGCKGRLVCYTSV-

nebo

- Arg Leu Asn Ser Trp Gly Cys Lys Gly Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser Val-
 1 5 10 15

7. Syntetický peptid podle nároku 1 až 6 mající jednu z následujících sekvencí

Peptid č. 1 (2B)

LLSLWGCRGKAVCYTSVQWNET

nebo

Leu Leu Ser Leu Trp Gly Cys Arg Gly Lys Ala Val Cys Tyr Thr Ser Val Gln Trp Asn
 1 5 10 15 20
 Glu Thr
 22

Peptid č. 2 (3B)

LLSLWGCRGRLVCYTSVQWNET

nebo

21.12.99

Leu Leu Ser Leu Trp Gly Cys Arg Gly Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser Val Gln Trp Asn

1 5 10 15 20

Glu Thr

22

Peptid č. 3 (4B)

LLSSWGCKGRLVCYTSVQWNET

nebo

Leu Leu Ser Ser Trp Gly Cys Lys Gly Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser Val Gln Trp Asn

1 5 10 15 20

Glu Thr

22

Peptid č. 4 (5B)

LLSSWGCKGRLVCYTSVQWNST

nebo

Leu Leu Ser Ser Trp Gly Cys Lys Gly Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser Val Gln Trp Asn

1 5 10 15 20

Ser Thr

22

Peptid č. 5 (6B)

LLQSWGCKGRLVCYTSVQWNST

nebo

Leu Leu Gln Ser Trp Gly Cys Lys Gly Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser Val Gln Trp Asn

1 5 10 15 20

Ser Thr

22

Peptid č. 6

LLNSWGCRGKAVCYTSVQWNET

nebo

Leu Leu Asn Ser Trp Gly Cys Arg Gly Lys Ala Val Cys Tyr Thr Ser Val Gln Trp Asn

1 5 10 15 20

Glu Thr

22

21.12.99

Peptid č. 7

LLSLWGCRGRAVCYTSVQWNET

nebo

Leu Leu Ser Leu Trp Gly Cys Arg Gly Arg Ala Val Cys Tyr Thr Ser Val Gln Trp Asn
1 5 10 15 20
Glu Thr
22

Peptid č. 8 (7B)

LLSSWGCRGRLVCYTSVQWNET

nebo

Leu Leu Ser Ser Trp Gly Cys Arg Gly Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser Val Gln Trp Asn
1 5 10 15 20
Glu Thr
22

Peptid č. 9 (12B)

LLSSWGCKGRLVCYTS

nebo

Leu Leu Ser Ser Trp Gly Cys Lys Gly Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser
1 5 10 15

Peptid č. 10 (14B)

LLNSWGCKGRLVCYTS

nebo

Leu Leu Asn Ser Trp Gly Cys Lys Gly Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser
1 5 10 15

Peptid č. 11 (18B)

ALETLLQNQQLLNSWGCRGRLVCYTSVRWNET

nebo

Ala Leu Glu Thr Leu Leu Gln Asn Gln Gln Leu Leu Asn Ser Trp Gly Cys Arg Gly
1 5 10 15
Arg Leu Val Cys Tyr Thr Ser Val Arg Trp Asn Glu Thr
20 25 30

21.12.99

Peptid č. 12 (19B)

ALETLLQNQQLLNIWGCRGRLVCYTSVRWNET

nebo

Ala	Leu	Glu	Thr	Leu	Leu	Gln	Asn	Gln	Gln	Leu	Leu	Asn	Ile	Trp	Gly	Cys	Arg	Gly
1				5						10					15			
Arg	Leu	Val	Cys	Tyr	Thr	Ser	Val	Arg	Trp	Asn	Glu	Thr						
20					25					30								

Peptid č. 13 (20B)

ALETLLQNQQLLDLWGCRGRLVCYTSVRWNET

nebo

-Ala	Leu	Glu	Thr	Leu	Leu	Gln	Asn	Gln	Gln	Leu	Leu	Asp	Leu	Trp	Gly	Cys	Arg	Gly
1				5						10					15			
Arg	Leu	Val	Cys	Tyr	Thr	Ser	Val	Arg	Trp	Asn	Glu	Thr						
20					25					30								

Peptid č. 14 (21B)

LNQQRLLNSWGCKGRLVCYTSV

nebo

Leu	Asn	Gln	Gln	Arg	Leu	Leu	Asn	Ser	Trp	Gly	Cys	Lys	Gly	Arg	Leu	Val	Cys	Tyr
1				5					10					15				
Thr	Ser	Val																
20																		

Peptid č. 15 (22B)

RALETLLNQQRLLNSWGCKGRLVCYTSV

nebo

Arg	Ala	Leu	Glu	Thr	Leu	Leu	Asn	Gln	Gln	Arg	Leu	Leu	Asn	Ser	Trp	Gly	Cys	Lys
1					5					10					15			
Gly	Arg	Leu	Val	Cys	Tyr	Thr	Ser	Val										
20					25													

Peptid č. 16 (23B)

RLNSWGCKGRLVCYTSV

nebo

Arg	Leu	Asn	Ser	Trp	Gly	Cys	Lys	Gly	Arg	Leu	Val	Cys	Tyr	Thr	Ser	Val
1					5					10				15		

8. Prostředek v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje alespoň jeden syntetický peptid podle nároku 1 až 7.
9. Prostředek podle nároku 8, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje peptid číslo 3 (4B) a peptid číslo 1 (2B).
10. Prostředek v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje alespoň jeden syntetický peptid obecného vzorce I podle nároku 1 a alespoň jeden rekombinovaný peptid HIV-1 skupiny O.
11. Prostředek v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje alespoň jeden syntetický peptid obecného vzorce I podle nároku 1 a alespoň jeden syntetický nebo rekombinovaný peptid HIV-1 a/nebo HIV-2.
12. Způsob imunizace, v y z n a č u j í c í s e t í m, že zavádí alespoň jeden syntetický peptid obecného vzorce I podle nároku 1 až 7.
13. Způsob imunizace, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se zavádí prostředek podle nároku 8 až 11.
14. Diagnostický kit, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje alespoň jeden syntetický peptid obecného vzorce I podle nároku 1 až 7 nebo prostředek podle nároku 8 až 11.

PETR KALENSKÝ
ATTORNEY AT LAW



CZ 19993575A3
Batch : PV001907

Date : 25/04/2006

Number of pages : 53

Previous document : CZ 20013195A3

Next document : CZ 20021819A3