

Szintetikus polipeptidek

PROTEUS MOLECULAR DESIGN LIMITED, Marple, Cheshire

Nagy-Britannia

A bejelentés napja: 1991. 03. 13.

Elsőbbsége: 1990. 03. 15. (9005829.8) Nagy-Britannia

A nemzetközi bejelentés száma: PCT/GB91/00392

A nemzetközi bejelentés száma: PCT/GB91/00392

KIVONAT

A találmány tárgyát képező polipeptidek legalább egy Humán Immundeficiencia Vírus (HIV) burokfehérjéjének legalább egy antigén tulajdonságát hordozzák, Egy előnyös szekvencia: X-

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

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

ahol X és Y jelentése az, hogy egymástól függetlenül hiányozhatnak illetve egymástól függetlenül egy vagy több aminosavat jelenthetnek, és a 10. valamint 16. pozícióban levő Cys csoportokat adott esetben intramolekuláris diszulfid híd kötheti össze. Ezeket a polipeptideket használhatják HIV fertőzés diagnosztizálásában, kezelésében és megelőzésében. A találmány tárgyát képezik még a polipeptidekhez kötődő antitestek és ezek kötődő részei is.

Original

63179

0000

KÉPVISELŐ:

DANUBIA SZABADALMI ÉS

VÉDJEGY IRODA KFT

~~BUDAPEST~~

2939/92 KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

NSZK 007 K 7108
AGK 37102

Reper

Szintetikus polipeptidek 200200000000

PROTEUS MOLECULAR DESIGN LIMITED, Marple, Cheshire

Nagy-Britannia

Feltalálók:

FISHLEIGH Robert, Vincent,

Macclesfield, Cheshire

ROBSON, Barry,

Marple Bridge, Cheshire

Nagy-Britannia

A bejelentés napja: 1991. 03. 13.

Elsőbbsége: 1990. 03. 15. (9005829.8) Nagy-Britannia

A nemzetközi bejelentés száma: PCT/GB91/00392

A nemzetközi közzététel száma: WO 91/13909

75485-215-SZÖ/KmO

A jelen találmány tárgyát szintetikus polipeptidek képezik. Főleg olyan szintetikus polipeptidek képezik a találmány tárgyát, amelyek vírus burokfehérjék specifikus régióinak háromdimenziós szerkezetét, és/vagy elektrosztatikus felszínét és/vagy más fizikai, kémiai és szerkezeti tulajdonságait utánozzák. Különösen érdekes vakcinákat, immunológiailag aktív terápiás ágenseket, diagnosztikumokat és más gyógyászati illetve a tudományos kutatásban használt ágenseket tervezni a Humán Immundeficiencia Vírussal (HIV) kapcsolatban, amelyről ismert, hogy a szerzett immunhiányos tünetegyüttes okozója.

Az elmúlt évtizedben az AIDS nagyon fontos gyógyászati problémává nőtte ki magát az egész világban, és jelenleg sürgős szükség van a HIV, a betegség okozója által kiváltott fertőzés vizsgálatához, diagnosztizálásához, kezeléséhez és/vagy megelőzéséhez használható ágensekre. A HIV I és HIV II vírusok által termelt fehérjék szekvenciájának ismertté válásával [lásd p. Ratner et al., Nature, 313, 277 (1985); Meusing, M.A. et al., Cell, 40, 9 (1985)] lehetséges lett olyan szintetikus polipeptidek tervezése, amelyek emulálják a vírus burokfehérjék antigén tulajdonságait.

A jelen találmány tárgya olyan szintetikus polipeptidek kifejlesztése, amelyek kiváltják a HIV vírus elleni antitestek termelődését, legelőnyösebb, ha ezek neutralizáló antitestek, azaz olyan antitestek, amelyek megelőzik a fertőzést, és/vagy megakadályozzák a HIV vírus terjedését passzív vagy aktív immunizáció útján. Az ilyen antitestekkel végzett passzív

immunizáció egy hatékony eszköz lehet AIDS betegek kezelésében, és így szabályozható a vírus elterjedése az emberekben illetve emberek között, ezzel lelassítva vagy megállítva a betegség fejlődését.

A jelen találmány tárgya egy olyan szintetikus polipeptid, amely a humán immundeficiencia vírus (HIV) legalább egyik törzsének a burokfehérjében levő antigén tulajdonságot hordozza, és az említett polipeptid lényegében a I aminosav szekvenciával rendelkezik:

I. Aminosav szekvencia

X-R₁-R₂-R₃-R₄-R₅-R₆-R₇-Trp-Gly-

Cys-R₈-R₉-R₁₀-R₁₁-R₁₂-Cys-Y

amely szekvenciában

R₁ jelentése Asp vagy Glu;

R₂ jelentése a Gly, Ala, Pro, Ser, Thr, Asn vagy Gln csoportból választott aminosav;

R₃ jelentése a Gly, Ala, Pro, Ser, Thr, Asp, Glu, Asn, Lys, His, Gln vagy Arg csoportból választott aminosav;

R₄, R₅, R₆ jelentése egymástól függetlenül bármely aminosav;

R₆ és R₈ jelentése egymástól függetlenül Gly, Ala, Pro, Ser, Thr vagy Asn;

R₇ jelentése a Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Ser, Thr, Asn, Gln, Phe, Tyr, Trp, Cys, Met vagy Pro csoportból választott aminosav;

R₉ és R₁₂ jelentése egymástól függetlenül a Gly, Ala, Leu, Ile, Val, Met, Cys, Phe, Tyr vagy Trp;

R₁₀ jelentése Lys, His vagy Arg; és

X és Y jelentése egymástól függetlenül lehet az, hogy hiányoznak, illetve az, hogy egy vagy több aminosav helyett állnak, azzal a feltétellel, hogy ha jelen vannak, akkor nem képezik, illetve nem képezik részét egyik Humán Immundeficiencia Vírus burokfehérjéje antigén tulajdonságokat mutató részének.

Az I általános képlet szerinti peptidek, amelyekben X és Y nincs jelen, természetesen hasznosak, például a HIV antitestek előállításában. Ha azonban X és Y jelen vannak, akkor bármilyen hosszúak lehetnek, de előnyös, ha 20 aminosavnál rövidebbek, még előnyösebb, ha 10 aminosavnál is rövidebbek, azaz például 3-6 aminosav hosszúak. Az természetesen elfogadható, hogy ha a I általános képlet szerinti szekvencia egy olyan fehérjét képez, amelyben X és Y egy nagy részt jelent, egy olyan antigén szekvenciával, amely egy globuláris fehérje exponált hurok struktúrájának részét képezi.

R₂ jelentése előnyösen lehet Gln vagy Thr, R₃ jelentése előnyösen lehet Ser, Asn, Gln, Arg vagy Ala, R₄ jelentése előnyösen lehet Leu, Ile, Gln vagy Arg, R₅ jelentése lehet Leu, vagy Lys, R₆ jelentése vagy Gly vagy Asn, R₇ jelentése Gly, Ala, Leu, Ile, Val, Met, Cys, Phe, Tyr, Trp vagy Ser, R₈ jelentése Ser vagy Ala, R₉ jelentése Gly vagy Phe, R₁₀ jelentése Arg vagy Lys, R₁₁ jelentése Leu, His, Ile, Gln és R₁₂ jelentése Ala, Ile vagy Val. A 10-es és 16-os pozícióban levő Cys csoportokat adott esetben intramolekuláris diszulfid-híd kötheti össze.



A találmány szerinti polipeptid egy előnyös formája a II általános képlettel leírható szekvenciát tartalmazza:

X-Asp-Gln-R₃-Leu-R₅-Gly-R₇-Trp-Gly-

Cys-Ser-Gly-Lys-R₁₁-R₁₂-Cys-Y,

amely szekvenciában

R₃, R₅, R₁₁, R₁₂, X és Y jelentése ugyanaz, mint amit az előzőekben meghatároztunk; és

R₇ jelentése a Gly, Ala, Leu, Ile, Val, Met, Cys, Phe, Tyr vagy Trp aminosav.

A II általános képletű szekvenciában előnyösen R₃ jelentése Ser, Asn, Gln vagy Arg, R₁₁ jelentése Leu, His vagy Ile, és R₁₂ jelentése Ile vagy Ala. Előnyös, ha R₇-et az Ile, Phe, Met, Val vagy Leu csoportból választjuk. Még előnyösebb, ha R₃ jelentése Ser vagy Asn és R₅ jelentése Lys.

A jelen találmány szerinti II általános képlet szerinti polipeptid az alábbi szekvenciát tartalmazza:

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

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

ahol x és Y jelentése ugyanaz, mint amit az előzőekben meghatároztunk, és a 10. valamint 16. pozícióban levő Cys csoportokat adott esetben intramolekuláris diszulfid híd kötheti össze.

A II általános képlet polipeptid egy másik előnyös formája az, amikor R₃ jelentése Gln vagy Arg, R₅ jelentése Leu, R₇ jelentése Ile, Phe, és Met, R₁₁ jelentése Leu, His, vagy Ile, és R₁₂ jelentése Ala. A II általános képlet szerinti polipeptid egy előnyös szekvenciája:

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

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

ahol x és Y jelentése ugyanaz, mint amit az előzőekben meghatároztunk, és a 10. valamint 16. pozícióban levő Cys csoportokat adott esetben intramolekuláris diszulfid híd kötheti össze.

A II általános képlet szerinti polipeptidek a HIV I burokfehérje bizonyos epitop részeire hasonlítanak.

A találmány szerinti polipeptid egy másik előnyös formája lényegében a III általános képletű aminosav szekvenciát tartalmazza:

X-R₁-R₂-R₃-R₄-R₅-Asn-Ser-Trp-Gly-Cys-Ala-

Phe-Arg-Gln-Val-Cys-Y (III)

ahol R_1 jelentése Glu vagy Asp;

R₂ jelentése Thr vagy Gln;

R₃ jelentése Ser, Asn, Arg, Gln vagy Ala;

R₄ jelentése Leu, Ile, Arg vagy Gln;

R₅ jelentése Lys vagy Leu; és

ahol x és Y jelentése ugyanaz, mint amit az előzőekben meghatároztunk, és a 10. valamint 16. pozícióban levő Cys csoportokat adott esetben intramolekuláris diszulfid híd kötheti össze.

A találmány szerinti polipeptid egy másik előnyös formája lényegében a IIIa általános képletű aminosav szekvenciát tartalmazza:

X-Glu-Thr-R₃-R₄-Lys-Asn-Ser-Trp-Gly-

Cys-Ala-Phe-Arg-Gln-Val-Cys-Y (IIIa)



ahol R_3 jelentése Ser, Asn, Arg, Gln vagy Ala, R_4 jelentése Leu, Ile, Arg, vagy Gln, X és Y jelentése ugyanaz, mint amit az előzőkben meghatároztunk, és a 10. valamint 16. pozícióban levő Cys csoportokat adott esetben intramolekuláris diszulfid híd kötheti össze. Előnyös, ha R_3 jelentése Ser, amikor R_4 jelentése Ile, és ha R_3 jelentése Ala, akkor R_4 jelentése vagy Gln vagy Arg, előnyösen Arg.

A III általános képletű polipeptid a HIV II vírus burokfehérjéinek bizonyos epitopjaira hasonlítanak.

A találmány szerinti előnyös polipeptid szekvenciákat azon az alapon választjuk meg, hogy topográfiailag mennyire hasonlítanak a HIV burokfehérje egynél több antigén determinánsához. Például, egy antigén determináns, amelyhez az adott polipeptidet analóggként megterveztük, mutathat topográfiai hasonlóságot a HIV burokfehérje egy vagy több másik régiójához, valószínűleg az eredeti gén duplikálódása következtében, vagy mivel a polipeptid analógja egy diszkontinuus determinánsnak, vagy mivel a polipeptidet úgy terveztük, hogy polivalens legyen. Egy diszkontinuus epitopot tekinthetünk úgy, hogy szorosan egymással szemben levő epitopokból állnak, amelyeknek önmagukban antigén jelentőségük van, és egy polivalens polipeptid tartalmazhat kettő vagy több (kontinuus vagy diszkontinuus) determináns analógot egyetlen polipeptid láncban, ezzel egyszerre kiváltva egy sor antitest termelődését, amelyek a HIV burokfehérjéken kettő vagy több determinánst képesek felismerni.

A találmány szerinti peptideket előállíthatjuk szintetikus úton, például a standard 9-fluorenil-metoxikarbonil



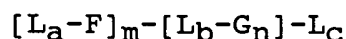
(F-Moc) kémia alkalmazásával [lásd például Atherton, E. and Sheppard, R.C., J.Chem. Soc. Chem. Comm., 165 (1985)], vagy standard butiloxi-karbonát (T-Boc) kémia alkalmazásával. A szerkezet pontosságát és a tisztaság mértékét, amelynek 85% fölötte kell lennie, alaposan ellenőrizni kell, és különös figyelmet kell szentelni a belső diszulfid-hidak elrendeződésének, ha jelen vannak. Különböző kromatográfiai elemzéseket, beleértve a nagynyomású folyadékkromatográfiát és spektroszkópiai elemzéseket, beleértve a Raman spektroszkópiát alkalmazhatunk erre a célra.

Az összes használt szekvenciát az aminosavakra kidolgozott standard IUPAC hárombetűs nevezéktan alkalmazásával írunk le, az alábbiak szerint: Gly-glicin, Ala-alanin, Val-valin, Leu-leucin, Ile-izoleucin, Ser-szerin, Thr-treonin, Asp-aszparaginsav, Glu-glutaminsav, Asn-aszparagin, Gln-glutamin, Lys-lizin, His-hisztidin, Arg-arginin, Phe-fenilalanin, Tyr-tirozin, Trp-triptofán, Cys-cisztein, Met-metionin és Pro-prolin.

A találmány szerinti polipeptideket vagy az ellenük készített antitesteket beadhatjuk önmagukban, illetve más ágensekkel együtt, például 3'-azido-3'-dezoxitimidinnel (AZT) (zidovudin), amely hatóanyag egy másik szinten hat, interferálva a vírus genetikai anyagának replikációjával, és/vagy a HIV proteáz inhibitorokkal, amelyek blokkolják egy, a vírus fejlődéséhez nélkülözhetetlen enzim hatását.

A találmány szerinti polipeptidek használhatók olyan antitestek előállítására, amelyek kereszt-reakciót adnak a HIV I

és/vagy HIV II törzsek által előállított burokfehérjékkel. Elemzéseink azt mutatják, hogy mivel a találmány szerinti polipeptidek konformációs/topografikus/elektrosztatikus tulajdonságai olyanok, hogy nagy valószínűséggel váltják ki olyan antitestek termelődését, amelyek kereszt-reakciót adnak néhány, vagy számos törzsből származó HIV burokfehérjével. További előny származik abból, ha néhány variáns polipeptidet egy nagyobb polipeptidben kombinálunk. Egy ilyen polipeptid általános képletét a IV-es általános képlet írja le:

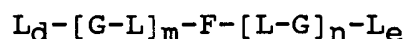


amelyben F és G jelentése egymástól függetlenül a I-IIIa általános képlet szerinti polipeptid lehet, L egy kapcsoló szekvencia, a b és c jelentése egymástól függetlenül lehet 0 vagy 1, m és n jelentése pozitív egész szám, 1 és 10 között. L előnyösen egy rövid, konformáció szempontjából flexibilis része a polipeptid láncnak, szekvenciája lehet például, anélkül hogy erre korlátoznánk magunkat, Gly-Gly-Gly-Gly-Gly, Gly-Pro-Gly-Pro-Gly-Pro vagy Gly-Ser-Ala-Gly-Ser-Gly-Ala. Az nyilvánvaló, hogy az egyes ismétlődések adott esetben a találmány szerinti polipeptid eltérő variánsát tartalmazhatják.

A IV. általános képlet alapján meghatározott polivalens determináns analógokat pszeudo-polihomovalenseknek nevezzük, amelyekben lényegében ugyanannak a determináns analógnak a variánsai ismétlődnek egyetlen polipeptid láncban. Emellett azok az egyszerű homopolivalens polipeptid immunogének is, amelyek az I-IIIa általános képletek bármelyike szerinti determináns analóg

variánsból tartalmaznak több másolatot, várhatóan hatékonyak, és ezek is a jelen találmány oltalmi körébe tartoznak.

A pszeudo-homopolivalens immunogén polipeptidek várhatóan különösen értékes vakcinák, egy sor (neutralizáló) antitest termelődését képesek indukálni, amelyek hasonló, de nem azonos specifitással rendelkeznek, kereszt-reakciót adnak szélesebb körből származó HIV törzsek burokfehérjéivel, ennél fogva sokkal hatékonyabban biztosítják az immunitást. Annak is megvannak az előnyei, ha olyan heteropolivalens polipeptideket készítünk, amelyek egy vagy több példányt tartalmaznak, bármely sorrendben, a jelen találmány szerinti polipeptidekből, és egy vagy több polipeptid analógot tartalmaznak a determináns analógok közül. Az ilyen, a jelen találmány szerinti polipeptidek szerkezetét az V. általános képlettel lehet leírni:



amelyben F jelentése az I-IIIa általános képletű polipeptidek közül bármelyik, G jelentése az I-IIIa általános képletű szekvenciák, vagy más szekvencia szerinti polipeptid, m és n jelentése pozitív egész szám 1 és 10 között, d és e jelentése egymástól függetlenül 0 vagy 1. "L" jelentése előnyösen egy rövid, konformáció szempontjából flexibilis polipeptid láncrész, például, anélkül hogy ezekre korlátoznánk magunkat, Gly-Gly-Gly-Gly-Gly, Gly-Pro-Gly-Pro-Gly-Pro vagy Gly-Ser-Ala-Gly-Ser-Gly-Ala. Az V. általános képletű polipeptid előnyös formáiban G lehet bármely, az I-IIIa általános képletekkel leírt polipeptid, illetve az alábbi szekvencia:



amelyben mindegyik Gly egymástól függetlenül helyettesíthető bármely más aminosavval, és/vagy X és Y egymástól függetlenül hiányozhat, vagy egy vagy több, például három aminosav vagy G állhat más polipeptid szekvenciából, amelyek a HIV antigén tulajdonságú fehérjéivel áll rokonságban.

Az nyilvánvaló, hogy bármelyik, antigén tulajdonságok szempontjából jelentős szubfragment és/vagy az előzőekben említett polipeptid szekvenciák antigén szempontból jelentős variánsai, amelyek megtartják a szülő polipeptid általános formáját és funkcióját, szintén a jelen találmány oltalmi körébe tartoznak. Pontosabban, a specifikus csoportok bármelyikét olyan csoportokkal helyettesíthetjük, amelyek összehasonlítható konformációs és/vagy fizikai tulajdonságokkal rendelkeznek, beleértve a ritka, (de a természetben előforduló, például D-sztereoizomer) vagy szintetikus aminosav analógokat is. Például, egy csoportnak egy ugyanabba az előzőekben leírt sorozatba tartozó csoporttal való helyettesítése is a találmány oltalmi körébe tartozik;

1-es sorozat: Ala, Val, Leu, Ile, Phe, Tyr, Trp, Met;

2-es sorozat: Ser, Thr, Asn, Gln;

3-as csoport: Asp és Glu;

4-es csoport: Lys, His, Arg;

5-ös csoport: Asn és Asp;

6-os csoport: Glu és Gln;

7-es csoport: Gly, Ala, Pro, Ser, Thr.

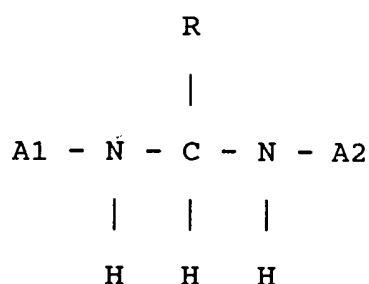
Mindegyik aminosavtípus helyettesíthető a D-sztereoizomerjével (D-Phe, D-Tyr és D-Trp).



A jelen találmány előnyös megvalósítási módjai szerint X és Y, ha jelen van, akkor egymástól függetlenül a fehérje szekvencia egy vagy több szegmentjét képezi, azzal a tulajdonsággal felruházva, hogy egy T-sejt epitopként képes működni. Például az 1-2-3-4 általános képletű aminosav szekvencia szegmentjei, ahol 1 jelentése Gly vagy egy töltött aminosav (azaz például Lys, His, Arg, Asp vagy Glu), 2 jelentése egy hidrofób aminosav (például Ile, Leu, Val, Met, Tyr, Phe, Trp, Ala), 3 jelentése vagy egy hidrofób aminosav (az előzőekben leírtak szerint), vagy egy töltés nélküli poláris aminosav (például Lys, Arg, His, Glu, Asp, Asn, Gln, Ser, Thr, Pro), képesek, legalábbis néhány esetben, T-sejt epitopként működni [Rothbard, J.B. & Taylor, W.R. (1988)]. Egy, a T-sejtekre jellemző szekvencia mintázat [EMBO Journal, 7(1), 93-100]. Hasonlóképpen, a szegmentek szekvenciája lehet 1'-2'-3'-4'-5', amelyben 1' ekvivalens az előzőekben leírt 1-gyel, 2' a 2-vel, 3' és 4' a 3-mal, és 5' a 4-gyel (im). Mindkét forma a jelen találmány oltalmi körébe tartozik, valamint egy vagy több (előnyösen ötnél kevesebb) T-sejt epitop, amelyek az előzőekben leírt típusúak lehetnek, és amelyeket bármilyen hosszúságú vagy összetételű határoló szegmentek választhatják el, előnyösen öt aminosavnál kevesebb, és Gly, Ala, Pro, Asn, Thr, Ser vagy polifunkciós linkerek lehetnek bennük, például nem- α aminosavak. Az lehetséges, hogy egy C- vagy N-terminális linker egy teljes fehérje legyen, ezzel ki lehet kerülni egy hordozó fehérjéhez való konjugációt.

Szintén a találmány oltalmi körébe tartoznak a I

általános képletű polipeptid származékok, amelyekben X vagy Y jelentése "retro-inverz" aminosav, azaz egy bifunkciós amin, amely egy aminosavnak megfelelő funkciós csoporttal rendelkezik. Például egy találmány szerinti analóg, amely egy retro-inverz aminosavat tartalmaz, az alábbi képlettel rendelkezhet:



ahol R jelentése bármely funkciós csoport, például glicin oldallánc, A1 és A2 mindegyik előnyösen egy, az alábbiakban meghatározott analógok másolata (de nem szükségszerűen ugyanaz), a C- vagy N-terminális véghez kapcsolva. A T-sejt epitópok is ide tartozhatnak adott esetben, amint azt az előzőekben megtárgyaltuk.

A peptidek retro-inverz módosítása magába foglalja egy vagy több peptidkötés reverzióját, ezzel olyan analógokat állítva elő, amelyek az eredeti molekulánál sokkal jobban ellenállnak az enzimes lebontásnak, és egy kényelmes módját jelentik az elágazó immunogének előállításának, amelyek nagy koncentrációban tartalmazzák egy közepes vagy nagy immunogén epitopját. Ezeknek a vegyületeknek az alkalmazása a rövidláncú biológiailag aktív peptidek retro-inverz analógjainak nagytérfogató, oldatban végzett szintézisével, nagy jelentőséggel bír.



Meg kell jegyeznünk, hogy retro-inverz aminosav származékokat tartalmazó analógok nem készíthetők közvetlenül egy rekombináns DNS rendszerben. Az alap analógok azonban előállíthatók, és ezek tisztíthatók majd kémiaiilag kapcsolhatók a retro-inverz aminosavakhoz, standard peptid/szerves-kémiát. A retro-inverz peptidek poliamid típusú gyantán végzett szilárd fázisú szintézisére egy gyakorlatban használható, kényelmes módszert írtak le nemrég [Gazerro, H. Pinori, M & Verdini, A.S. (1990); A new general procedure for the solid-phase synthesis of retro-inverso peptides; in "Innovation and Perspectives in Solid Phase Synthesis", Ed. Roger Epton SPCC (UK) Ltd., Birmingham, UK].

A polipeptideket adott esetben egy hordozó molekulához kötjük, akár a polipeptidekben található kémiai csoportokon keresztül, akár a C- vagy N-terminálison hozzáadott plusz aminosavakon keresztül, és amelyeket a polipeptidektől el lehet választani, vagy egy vagy több aminosavval körül lehet venni, abból a célból, hogy optimálissá tegyük immunológiai reakcióikat. Számos kötés használható, ideértve a Tyr, Cys és Lys csoportok oldalláncainak alkalmazását. Az alkalmas hordozók közé tartoznak például a tuberkulin (PPD), tetanusz toxoid, kolera toxin és B alegysége, az ovalbumin, szarvasmarha szérumalbumin, szójabab tripszin inhibítor, muramil dipeptid és analógjaik, valamint a Braun féle lipoprotein, jóllehet más alkalmas hordozók is ismertek a szakterületen jártas szakember számára. Ha a PPD-t használjuk a találmány szerinti polipeptidek hordozójaként, akkor az antitestek magasabb titere érhető el, ha



a polipeptid-PPD konjugátum befogadója már tuberkulin érzékeny, például egy korábbi BCG vakcina következtében. Humán vakcina esetében érdemes megemlíteni, hogy Angliában és számos más országban a népességnek rutinszerűen adják be a BCG vakcinát, és ezért erősen PPD érzékenyek az emberek. Ezért várható, hogy ezekben az országokban a PPD az előnyben részesített hordozó.

Annak a módja, hogy a polipeptidet miként kapcsoljuk a hordozóhoz, függ a kapcsolandó anyagok természetétől. Például a hordozóban levő lizincsoport egy C-terminális vagy egyéb ciszteincsoporthoz kapcsolható egy polipeptiden, ha N-gamma-maleimidobutiriloxi-szukcinimiddel kezeljük [Kitagawa, T. and Ackawa, T., *Journal of Biochemistry*, 79, 233 (1976)]. Az irodalomban más kapcsoló reakciókat és reagenseket is leírtak.

A polipeptidek, egymagukban, vagy egy hordozó molekulához kapcsolva, bármely módon beadható (például parenterálisan, nazálisan, orálisan, rektálisan, intra-vaginálisan), szokványos adjuvánsok alkalmazásával vagy anélkül (például alumínium-hidroxiddal vagy Freund féle komplett vagy inkomplett adjuvánsok), és/vagy más immunpotencírozó hatóanyaggal együtt. A találmány tárgyát képezi továbbá a találmány szerinti polipeptidek formulázása szabályozott felszabadulású formában, például bőralatti implantátum vagy depo formájában, amelyek például liposzómákat tartalmaznak [Allison, A.C. and G. Gregoriadis, G., *Nature*, (London) 252, 252 (1974) vagy biológiailag lebomló mikrokapszulákat, amelyeket tejsav és glikolsav kopolimereként állítunk elő [Gresser, J.D. and Sanderson, J.E., "Biopolymer Controlled Release Systems", 127-

138, Ed. D.L.Wise (1984)]].

Az nyilvánvaló, hogy a találmány szerinti polipeptideket bármely szokványos módszerrel megszintetizálhatjuk, akár közvetlenül, manuális vagy automatizált peptid-szintézis módszer alkalmazásával, amint az előzőekben leírtuk, akár indirekt módon RNS és DNS szintézissel és a molekuláris biológia valamint génsebészet szokványos technikáinak alkalmazásával. Ezeket a technikákat használhatjuk olyan hibrid fehérjék előállítására, amelyek egy vagy több polipeptidet tartalmaznak egy másik polipeptid szekvenciába beépítve.

A jelen találmány tárgya továbbá olyan DNS molekula előállítása, amely legalább egy, a találmány szerinti szintetikus polipeptidet kódol, előnyösen egy alkalmas expressziós vektorba beépítve, amely mikroorganizmusokban vagy emlős sejtekben képes replikálódni. A DNS lehet egy hosszabb termék DNS szekvenciájának része is, azaz a polipeptideket más fehérjék részeként lehet expresszálni, amelyekbe génsebészeti módszer beépítettük őket [Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989)].

A találmány szerinti polipeptideket használhatjuk önmagukban, vagy egy megfelelő hordozóval elkeverve:

(a) Peptid vakcinaként, abból a célból, hogy megakadályozzuk egy vagy több HIV törzzsel való fertőződést;

(b) Ligandumként HIV pozitív betegek szérumának vizsgálatában;

(c) Minőségellenőrző hatóanyagként, például a polipep-



tidek ellen készített antitestek kötőképességének vizsgálatakor;

(d) Antigén ágensekként monoklonális vagy poliklonális antitestek készítésére a megfelelő állat immunizálásával; az ilyen antitesteket az alábbi célokra használjuk:

- (i) A HIV vírus tudományos célú vizsgálata;
- (ii) Diagnosztikai ágensként, például hisztokémiai reagensek részeként;
- (iii) HIV betegek passzív immunizálására, az AIDS kezelése céljából vagy önmagában, vagy más anyagokkal kombinálva, például AZT-vel és/vagy HIV proteáz inhibitorokkal, és
- (iv) Eszközként arra a célra, hogy más ágenseket (például AZT vagy HIV proteáz inhibitor) a felszínükön HIV burokfehérjét expresszáló HIV vírussal fertőzött sejtekhez irányítsuk. Az ilyen anyagok lehetnek kovalens kötással vagy más módon összekapcsolva, például liposzómákba vive ezeket a hatóanyagokat, és antitesteket készítve valamelyik antigén tulajdonságú polipeptid ellen.

A találmány tárgyát képezik továbbá a alkotórészek, különösen a V_H régiók génsebészeti úton módosított formái, a polipeptidek ellen készített antitestek, és az eredetileg más állatban előállított, a polipeptid ellen készített antitestek humanizált formái, az szakirodalomban leírt technikák alkalmazásával; és

(e) A HIV fertőzések kezelése, vagy úgy, hogy a HIV



vírust leszorítjuk a humán vagy állati sejtekről, vagy úgy hogy in vivo megzavarjuk a vírus háromdimenziós szerveződését; valamint azáltal, hogy elősegítjük a HIV vírusok tudományos vizsgálatát in vitro körülmények között.

Ami a HIV és a HIV elleni antitestek kimutatását és diagnózis át illeti, a szakterületen jártas szakember számára számos, a szakirodalomban ismertett immunesszé technika ismert, többek között a szendvics esszé, kompetitív és nem kompetitív vizsgálatok és a direkt vagy indirekt jelölés alkalmazása.

A találmány tárgyát képezi továbbá egy, a HIV vagy a HIV elleni antitestek kimutatására használható kit, amely legalább egy, a találmány szerinti peptidet tartalmaz.

A poliklonális vagy monoklonális antitestek, az ilyen antitestek humanizált formái [lásd például Thompson et al., Immunology, 58, 157-160 (1986)], egydoménes antitestek [lásd például Ward, E.S., Gussow, D., Griffiths, A.D., Jones, P. és Winter, G., Nature, 341, 544-546 (1989)], valamint az agy-vér gáton átjutni képes antitestek előállítás, amelyek specifikusan kapcsolódnak a jelen találmány szerinti szintetikus polipeptidekhez, szokványos módszerekkel végezhető el, és az ilyen antitesteket a találmány oltalmi körébe tartozónak tartjuk. A találmány szerinti antitestek többek között használhatók emlős HIV fertőzés diagnosztizálására, ami abban áll, hogy egy emlős szövetmintát vagy testfolyadékot az előzőekben leírt antitest hatásos mennyiségével inkubáljuk, és meghatározzuk, hogy ha szükséges, hogy az említett minta és az



említett antitest között milyen mértékben és/vagy milyen sebességgel alakul ki kereszt-reakció. Az említett antitestek közül legalább egyet tartalmazó diagnosztikai kitek is a jelen találmány részét képezik.

A jelen találmány tárgyát képezi továbbá szintetikus polipeptidek alkalmazása emlős HIV fertőzés terápiájában vagy profilaxisában és/vagy az emlős immunrendszer serkentésében és/vagy a HIV vírus sejtreceptorok blokkolásában, valamint az ilyen alkalmazások céljaira megfelelő gyógyászati készítmények előállítása. Ide tartoznak azok a gyógyászati készítmények is, amelyek aktív adalékanyagként az előzőekben leírt polipeptidek vagy polipeptid-hordozó konjugátumok közül legalább egyet tartalmaz, egy vagy több gyógyászatilag elfogadható adjuvánssal, hordozóval és/vagy töltőanyaggal együtt. A készítményeket formulázhatjuk orális, rektális, nazális vagy speciálisan parenterális adagolás céljára (beleértve az intra-CNS adagolást is).

A találmány tárgyát képezi továbbá emlős HIV fertőzés gyógyításának vagy megelőzésének módszere és/vagy az emlős immunrendszer serkentésének módszere és/vagy a HIV vírus sejtreceptorainak blokkolási módszere, ami abban áll, hogy az előzőekben meghatározott polipeptidből hatásos mennyiséget adunk be, akár egymagában, akár más anyagokkal kombinációban az AIDS kezelése céljából, úgymint AZT-nel és/vagy HIV proteáz inhibitorokkal.

Az alábbi példákkal az a célunk, hogy illusztráljuk a találmányt, és nem tekinthetők a találmány korlátozásának.

1. Példa

Az alábbi szekvenciával rendelkező alap-peptid

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

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

C-terminálisán meghosszabbított formáját standard szilárd fázisú F-moc technológiával állítjuk elő, és intramolekuláris diszulfid-hidakat hozunk létre a két Cys csoport között. A peptidet lehasítjuk a gyantáról trifluor-ecetsav jelenlétében, majd a peptidet ezután gélszűrőssel, ioncserélő kromatográfiával és fordított fázisú nagynyomású folyadékkromatográfiával tisztítjuk. A keletkező peptid tisztasága jobb mint 85%. A C-terminális alanint a konjugáció elősegítése céljából építettük be. A peptidet foszfáttal puffereelt sóoldatban oldjuk (PBS; 5 mg/ml), majd azonos térfogatú ovalbuminnal elegyítjük (5 mg/ml) mielőtt glutáraldehidet adnánk hozzá 0,1 tömeg/térf százalék végkoncentrációban glutáraldehidet adunk hozzá. A konjugált elegyet 30 percig hagyjuk állni, mielőtt Freund féle komplett adjuvánssal keverjük össze. Mindegyik birkát (5 állat/csoport) 250 µg, Freund féle komplett adjuvánssban levő peptiddel immunizálunk, majd 14 nap elteltével hasonló mennyiségű fehérjével (freund féle inkomplett adjuvánssban (FIA)) megerősítjük a hatást. A további megerősítéseket 3-4 hét elteltével FIA alkalmazásával végezzük. Vérmintákat a megerősítés után 7-10 nappal veszünk, és vizsgáljuk, hogy van-e kötődés a HIV burokfehérjéhez.

Azoknak az anti-szintetikus peptid antitesteknek a meghatározása, amelyek a HIV burokfehérjét felismerik, úgy végez-

zük, hogy egy rekombináns vakcína vírust alkalmazunk [lásd például Macket, M. and Smith, G.L., Journal of General Virology, 67, 2067 (1986), ebben az általános módszert írják le], amelyet arra a célra készítették, hogy a HIV burokfehérjét expresszálna a fertőzött sejtek felszínén. Ez a vizsgálati módszer azért előnyös, mert az antigénhez való kötődést a vírussal fertőzött sejt felszínén mérjük, és ennél fogva sokkal jellemzőbb, mint az oldat-fázisban levő antigénhez való kötődés (például azért, mert bizonyos potenciális epitopok a burokfehérjéken in vivo körülmények között maszkolva lehetnek, a membrán foszfolipidekkel való kölcsönhatás következtében). CV1 majomvese sejteket, amelyek 96 lukas mikrotiter lemezekben egysejtréteg formájában nőnek, rekombináns vakcína vírussal fertőzünk. A vírus konstrukció tartalmazza a HIV burokfehérje glikoproteint tartalmazó gént, és a fehérjéről ismert, hogy a fertőzött sejt felszínén expresszálódik és processzálódik. A birkákból származó szérumokat két párhuzamosan vizsgáljuk. Az antiszérumból különböző hígításokat készítünk, és ezekből 50-50 μ l-t adunk a lukakhoz, majd a kétszeri mosás előtt 4 óra hosszat inkubáljuk, majd egy második, peroxidázzal jelzett anti-birka szérumot adunk hozzá. A pozitív sejteket úgy határozzuk meg, hogy mikrotiter lemezleolvasóval meghatározzuk az optikai denzitásokat.

Az antipeptid antiszérumokról azt találtuk, hogy nagy affinitással adnak kereszt-reakciót a fertőzött sejtek felszínén expresszált HIV burokfehérjével (lásd az 1. táblázatot és az 1A táblázatot). Ezek az eredmények megerősítik, hogy ezek az antipeptid antitestek értékes kutatási eszközök és diagnosztikai ágensek.

1. Táblázat

Keresztreakció a peptid (a) konjugátum és a majomvese sejt felszínén expresszáldott rekombináns HIV burokfehérje között. "-" jelzi azt, hogy nincs keresztreakció, "+++" azt jelzi, hogy a keresztreakció nagyon erős.

<u>Keresztreakció</u>		
	Kontroll majomvese sejtvonal	HIV burokfehérjét expresszáldó majomvese sejtvonal
Immunizált birkából származó szérum	-	+++
Kontroll szérum	-	-



1A Táblázat

Peptid (a) konjugátummal immunizált birkák pozitív antiszérumának tipikus titerei, majomvese sejtek felszínén expresszált rekombináns HIV burokfehérjével való reakcióban

Átlagos optikai sűrűség
(szérum hígítás)

Szérumminta (titer) 1/50 1/250 1/1250 1/31250 1/156250

Kontroll

birkaszérum 0,344 0,288 0,197 0,012 0,016

Peptid (a)-val

kezelt birkaszérum

1/5000 hígításban 0,736 0,636 0,432 0,140 0,052

A fenti táblázat eredményei azt mutatják, hogy a teszt-birkából származó szérum jelentős hígítás mellett is nagymértékben megnövekedett titert mutat a kontrollhoz viszonyítva.

2. Példa

A neutralizáló antitestek egyik szerepe az, hogy gátolják a vírus transzmisszióját a fertőzött és a nem-fertőzött sejtek között. A vírusnak T-sejtekből a makrofágokba való átjutásának megakadályozása vagy sebességének csökkentése meghatározó fontosságú, mivel ez jelentősen képes meghosszabbítani az AIDS betegek élettartamát. Az anti-peptid antiszérumnak vizsgáljuk a tulajdonságait, hogy képes-e a szcintíciumok képződését megakadályozni in vitro körülmények között. A szcintíciumok többmagvú óriás-sejtek, amelyek a HIV-

sejtek közötti "hídképződés" eredményei.

Az alap peptid (a) C-terminálisán meghosszabbított formáját, amelynek szekvenciája az alábbi:

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

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

és a két Cys csoport között intramolekuláris hidat tartalmaz, az 1. példában leírtak alapján szintetizáljuk, tisztítjuk, konjugáljuk, és használjuk a birkacsoportok immunizálására. Az antipeptid antiszérumokat in vitro HIV neutralizációs vizsgálatban alkalmazzuk. Az antipeptid antitesteket erősen virulens HIV törzzsel fertőzött T-limfocita valamint nem-fertőzött humán makrofágok in vitro tenyészetébe juttatjuk be. Az antipeptid antiszérumokról kiderült, hogy gátolják a szcintíciumok képződését a T-sejteknek és makrofágoknak ebben a kevert populációjában, amelyeket virulens HIV hatásának teszünk ki, azaz ezek meggátolják a HIV fertőzésnek a T-sejtekről a makrofágokra való terjedését.

Az antitestekről kiderült, hogy megakadályozzák azt, hogy a makrofágokat HIV fertőzze meg, ennél fogva neutralizáló hatásúak ebben az in vitro vizsgálatban, míg a makrofágok egy kontroll tenyészetben befertőződnek, amint a 2. táblázatban látható.

2. Táblázat

HIV virulens törzs neutralizálása HIV-vel fertőzött humán T-limfociták in vitro tenyésztésében és fertőzetlen humán makrofágokban. "+++" jelentése magas fertőzési szint, "-" jelentése hatékony védelem a fertőzéssel szemben.

Sejttenyészet	A makrofág fertőzés szintje
HIV-vel fertőzött T-limfociták és csak fertőzetlen makrofágok	+++
HIV-vel fertőzött T-limfociták, fertőzetlen makrofágok és anti-peptid (a) antitestek	-

Emellett a peptid (a) elleni pozitív antiszérumokat értékeltük egy szcintícium vizsgálatban. Ez a vizsgálat meghatározza az antiszérumoknak azt a képességét, hogy megakadályozzák az élő HIV elterjedését a fertőzött sejtekről a fertőzetlenekre, és hogy megakadályozzák a sejtek fúzióját, amit a vírus glikoprotein (gp160) és a CD4 molekulák egymással való reagálóképessége okoz. A méréseket szcintícium detektálással és számlálással végezzük.

A szcintícium vizsgálatokat az alábbiak szerint végezzük: egy HIV termelő (CD+4) sejtvonal ismert koncentrá-

cióját, ami a vírus replikációját támogatja, háromszor mossuk, és a vizsgált antiszérummal elegyítjük, és specifikus higításokban használjuk. 30 percig 37°C-on inkubáljuk, majd a sejteket összekeverjük meghatározott arányban egy indikátor CD+4 sejt vonallal, amely nagyon érzékeny a HIV fertőzésre és a szcintícium indukcióra. A sejteket naponta ellenőrizzük, hogy keletkezik-e szcintícium.

A peptid (a) elleni antitestekről kiderült, hogy gátolják a szcintíciumok képződését (3. táblázat).

3. Táblázat

Szcintícium gátlása antiszérumokkal HIV-vel fertőzött termelő sejtek és egy indikátor sejt vonal között

<u>Szérum-minta</u>	<u>Szcintícium gátlás</u>
Antipeptid (a) antiszérum	+ (3/5 állat)
Normál birkaszérum	-

3. Példa

A szerzett immunhiányos szindróma (AIDS) megbetegedés különböző stádiumaiban (szimptóma-mentestől a maximálisan kifejezett szimptómáig) levő HIV-1-gyel fertőzött egyedekből származó szérum-panelt arra használjuk, hogy az ilyen betegekből származó szérumoknak a szintetikus peptidekkel ELISA-ban mutatott reaktivitásáról egy jellemző képet kapjunk.

Az ELISA eljárás meghatározza a szintetikus peptidek (a gp120 vagy gp41 HIV-1 transzmembrán fehérjék régióinak

analógjai) reaktivitásának mértékét a HIV-1 felületi glikoproteinjével szemben HIV-1 pozitív egyedek szérumban.

A HIV pozitív egyedekből származó száz antiszérumban reagált a szintetikus peptid (a)-val. Ezek közül a szérumban közül kettő (szimptomamentes egyedekből) HIV-et neutralizáló antitesteket tartalmazott, és kereszt-reakciót adott a peptid (a)-val, amint az a 4. táblázatban látható.

4. Táblázat

A peptid (a) kereszt-reaktivitása két, tünetmentes egyedből származó HIV pozitív antiszérumban

<u>Minta</u>	<u>OD (peptid (a))</u>	
Puffer	0,056	
Normál szérumban 1/100	0,476	
1/1000	0,140	
HIV pozitív (1) 1/100	>2,0	
1/1000	>2,0	
HIV pozitív (2) 1/100	>2,0	
	>2,0	ismétlések
	1,37	

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Szintetikus polipeptid, azzal jellemezve, hogy a humán immundeficiencia vírus (HIV) legalább egyik törzsének a burokfehérjéjében levő antigén tulajdonságot hordozza, és az említett polipeptid lényegében a I aminosav szekvenciával rendelkezik:

X-R₁-R₂-R₃-R₄-R₅-R₆-R₇-Trp-Gly-

Cys-R₈-R₉-R₁₀-R₁₁-R₁₂-Cys-Y

amely szekvenciában

R₁ jelentése Asp vagy Glu;

R₂ jelentése a Gly, Ala, Pro, Ser, Thr, Asn vagy Gln csoportból választott aminosav;

R₃ jelentése a Gly, Ala, Pro, Ser, Thr, Asp, Glu, Asn, Lys, His, Gln vagy Arg csoportból választott aminosav;

R₄, R₅, R₆ jelentése egymástól függetlenül bármely aminosav;

R₆ és R₈ jelentése egymástól függetlenül Gly, Ala, Pro, Ser, Thr vagy Asn;

R₇ jelentése a Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Ser, Thr, Asn, Gln, Phe, Tyr, Trp, Cys, Met vagy Pro csoportból választott aminosav;

R₉ és R₁₂ jelentése egymástól függetlenül a Gly, Ala, Leu, Ile, Val, Met, Cys, Phe, Tyr vagy Trp;

R₁₀ jelentése Lys, His vagy Arg; és

X és Y jelentése egymástól függetlenül lehet az, hogy hiányoznak, illetve az, hogy egy vagy több aminosav helyett állnak, azzal a feltétellel, hogy ha jelen vannak, akkor nem képezik, illetve nem képezik részét egyik Humán Immundeficiencia Vírus burokfehérjéje antigén tulajdonságokat mutató részének.

2. Az 1. igénypont szerinti szintetikus polipeptid, azzal jellemezve, hogy R₂ jelentése Gln vagy Thr, R₃ jelentése Ser, Asn, Gln, Arg vagy Ala, R₄ jelentése Leu, Ile, Gln vagy Arg, R₅ jelentése lehet Leu, vagy Lys, R₆ jelentése vagy Gly vagy Asn, R₇ jelentése Gly, Ala, Leu, Ile, Val, Met, Cys, Phe, Tyr, Trp vagy Ser, R₈ jelentése Ser vagy Ala, R₉ jelentése Gly vagy Phe, R₁₀ jelentése Arg vagy Lys, R₁₁ jelentése Leu, His, Ile, Gln és R₁₂ jelentése Ala, Ile vagy Val.

3. A 2. igénypont szerinti szintetikus polipeptid, azzal jellemezve, hogy a II általános képlettel leírható szekvenciát tartalmazza:

X-Asp-Gln-R₃-Leu-R₅-Gly-R₇-Trp-Gly-

Cys-Ser-Gly-Lys-R₁₁-R₁₂-Cys-Y,

amely szekvenciában

R₃, R₅, R₁₁, R₁₂, X és Y jelentése ugyanaz, mint amit az

1. igénypontban meghatároztunk; és

R₇ jelentése a Gly, Ala, Leu, Ile, Val, Met, Cys, Phe, Tyr vagy Trp aminosav.

4. A 3. igénypont szerinti szintetikus polipeptid, azzal jellemezve, hogy R₃ jelentése Ser, Asn, Gln vagy Arg, R₁₁ jelentése Leu, His vagy Ile, és R₁₂ jelentése Ile vagy Ala.

5. A 4. igénypont szerinti szintetikus polipeptid,

azzal jellemezve, hogy R_7 jelentése Ile, Phe, Met, Val vagy Leu.

6. Az 5. igénypont szerinti szintetikus polipeptid, azzal jellemezve, hogy R_3 jelentése Ser vagy Asn, R_5 jelentése Lys.

7. Az 1-6. igénypontok bármelyike szerinti szintetikus polipeptid, azzal jellemezve, hogy az alábbi szekvenciát tartalmazza:

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

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

ahol X és Y jelentése ugyanaz, mint amit az 1. igénypontban meghatároztunk.

8. A 3. igénypont szerinti szintetikus polipeptid, azzal jellemezve, hogy R_3 jelentése Gln vagy Arg, R_5 jelentése Leu, R_7 jelentése Ile, Phe vagy Met, R_{11} jelentése Leu, His vagy Ile és R_{12} jelentése Ala.

9. A 8. igénypont szerinti szintetikus polipeptid, azzal jellemezve, hogy az alábbi szekvenciát tartalmazza:

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

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

ahol x és Y jelentése ugyanaz, mint amit az 1. igénypontban meghatároztunk.

10. A 2. igénypont szerinti szintetikus polipeptid, azzal jellemezve, hogy lényegében a III általános képlet szerinti aminosav szekvenciát tartalmazza:

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

Phe-Arg-Gln-Val-Cys-Y (III)

ahol R_1 jelentése Glu vagy Asp;

R_2 jelentése Thr vagy Gln;

R_3 jelentése Ser, Asn, Arg, Gln vagy Ala;

R_4 jelentése Leu, Ile, Arg vagy Gln;

R_5 jelentése Lys vagy Leu; és

ahol x és Y jelentése ugyanaz, mint amit az 1.

igénypontban meghatároztunk.

11. A 2. vagy 10. igénypont szerinti szintetikus polipeptid, azzal jellemezve, hogy lényegében a IIIa általános képletű aminosav szekvenciát tartalmazza:

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

Cys-Ala-Phe-Arg-Gln-Val-Cys-Y (IIIa)

ahol R_3 jelentése Ser, Asn, Arg, Gln vagy Ala, R_4 jelentése Leu, Ile, Arg, vagy Gln, X és Y jelentése ugyanaz, mint amit az 1. igénypontban meghatároztunk.

12. A 11. igénypont szerinti szintetikus polipeptid, azzal jellemezve, hogy R_3 jelentése Ser, ha R_4 jelentése Ile vagy R_3 jelentése Ala, ha R_4 jelentése Arg vagy Gln.

13. Az előző igénypontok bármelyike szerinti szintetikus polipeptid, azzal jellemezve, hogy 10. és 16. pozícióban levő Cys csoportokat intramolekuláris diszulfid híd köti össze.

14. A IV általános képlet szintetikus polipeptid,

$[L_a-F]_m-[L_b-G_n]-L_c$

azzal jellemezve, hogy F és G jelentése egymástól függetlenül a I-IIIa általános képlet szerinti polipeptid, L egy kapcsoló szekvencia, a b és c jelentése egymástól függetlenül 0 vagy 1, m és n jelentése pozitív egész szám.

R_2 jelentése Thr vagy Gln;

R_3 jelentése Ser, Asn, Arg, Gln vagy Ala;

R_4 jelentése Leu, Ile, Arg vagy Gln;

R_5 jelentése Lys vagy Leu; és

ahol x és Y jelentése ugyanaz, mint amit az 1.

igénypontban meghatároztunk.

11. A 2. vagy 10. igénypont szerinti szintetikus polipeptid, azzal jellemezve, hogy lényegében a IIIa általános képletű aminosav szekvenciát tartalmazza:

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

Cys-Ala-Phe-Arg-Gln-Val-Cys-Y (IIIa)

ahol R_3 jelentése Ser, Asn, Arg, Gln vagy Ala, R_4 jelentése Leu, Ile, Arg, vagy Gln, X és Y jelentése ugyanaz, mint amit az 1. igénypontban meghatároztunk.

12. A 11. igénypont szerinti szintetikus polipeptid, azzal jellemezve, hogy R_3 jelentése Ser, ha R_4 jelentése Ile vagy R_3 jelentése Ala, ha R_4 jelentése Arg vagy Gln.

13. Az előző igénypontok bármelyike szerinti szintetikus polipeptid, azzal jellemezve, hogy 10. és 16. pozícióban levő Cys csoportokat intramolekuláris diszulfid híd köti össze.

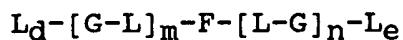
14. A IV általános képlet szintetikus polipeptid,

$[L_a-F]_m-[L_b-G]_n-L_c$

azzal jellemezve, hogy F és G jelentése egymástól függetlenül a I-IIIa általános képlet szerinti polipeptid, L egy kapcsoló szekvencia, a b és c jelentése egymástól függetlenül 0 vagy 1, m és n jelentése pozitív egész szám.



15. A (V) általános képletű szintetikus polipeptid,



azzal jellemezve, hogy F jelentése az I-IIIa általános képletű polipeptidek közül bármelyik, G jelentése az I-IIIa általános képletű szekvenciák, vagy más szekvencia szerinti polipeptid, m és n jelentése pozitív egész szám 1 és 10 között, d és e jelentése egymástól függetlenül 0 vagy 1.

16. Az előző igénypontok bármelyike szerinti szintetikus polipeptid, azzal jellemezve, hogy egy retro-inverz aminosavat tartalmaz.

17. Szintetikus polipeptid, azzal jellemezve, hogy az 1-13. igénypontok bármelyike szerinti polipeptidnek egy antigén szempontból lényeges szubfragmentjét vagy variánsát tartalmazza.

18. Az előző igénypontok bármelyike szerinti szintetikus polipeptid, azzal jellemezve, hogy legalább egy T-sejt epitópot tartalmaz.

19. Az 1-18. igénypontok bármelyike szerinti szintetikus polipeptid, azzal jellemezve, hogy egy vakcina hordozóhoz van kötve.

20. Az 1-19. igénypontok szerinti szintetikus polipeptidek közül legalább egyet tartalmazó vakcina, azzal jellemezve, hogy legalább egy HIV törzzsel szemben elősegíti az immunitás kialakulását.

21. HIV, vagy HIV elleni antitestek kimutatására alkalmas kit, azzal jellemezve, hogy az 1-18. igénypontok bármelyikében definiált szintetikus polipeptidek közül legalább egyet tartalmaz.



22. DNS molekula, azzal jellemezve, hogy az 1-18. igénypontok bármelyikében leírt szintetikus polipeptidek közül legalább egyet kódol.

23. Gyógyászati készítmény, azzal jellemezve, hogy aktív adalékanyagként legalább egyet tartalmaz az 1-19. igénypontok bármelyikében leírt polipeptidek közül, egy vagy több gyógyászatilag elfogadható adjuvánssal, hordozóval és/vagy töltőanyaggal együtt.

24. Az 1-19. igénypontok bármelyikében leírt szintetikus polipeptid alkalmazása emlős HIV fertőzés terápiás vagy megelőző kezelésére, és/vagy az emlős immunrendszerének serkentésére és/vagy a HIV vírus sejtreceptorainak blokkolására.

25. Eljárás emlős HIV fertőzés gyógyítására vagy megelőzésére, és/vagy az emlős immunrendszer serkentésére, és/vagy a HIV vírus sejtreceptorainak blokkolására, azzal jellemezve, hogy az 1-19. igénypontok bármelyike szerinti polipeptidből hatékony mennyiséget adunk be a betegnek.

26. Eljárás HIV, HIV elleni antitestek vagy ezeknek antigén-kötő fragmentjeinek kimutatására, azzal jellemezve, hogy egy mintát az 1-19. igénypontok bármelyike szerinti polipeptiddel inkubáljuk.

27. Egy antitest vagy annak antigén-kötő fragmentje, azzal jellemezve, hogy specifikusan kötődik az 1-19. igénypontok bármelyike szerinti szintetikus polipeptidhez.

28. Diagnosztikai kit HIV vagy HIV elleni antitestek kimutatására, azzal jellemezve, hogy legalább egy, a 27. igénypont szerinti antitestet tartalmaz.



29. Gyógyászati készítmény, azzal jellemezve, hogy aktív adalékanyagként egy, a 27. igénypont szerinti antitestet tartalmaz, egy vagy több gyógyászatileg elfogadható adjuvánssal, hordozóval és/vagy töltőanyaggal.

30. A 23. vagy 29. igénypont szerinti gyógyászati készítmény, azzal jellemezve, hogy AZT-t és/vagy egy HIV proteáz inhibítort tartalmaz.

31. Eljárás emlős HIV fertőzés diagnosztizálására, azzal jellemezve, hogy egy emlős szövetmintát vagy testfolyadékot egy, a 27. igénypont szerinti antitest hatásos mennyiségével inkubáljuk, és meghatározzuk, szükség esetén a mértékét is, hogy az említett minta és az említett antitest között van-e, és ha van, akkor milyen mértékű a keresztreakció.

32. Eljárás szintetikus polipeptid előállítására, amely a humán immundeficiencia vírus (HIV) legalább egyik törzsének a burokfehérjéjében levő antigén tulajdonságot hordozza, és az említett polipeptid lényegében a I aminosav szekvenciával rendelkezik:

X-R₁-R₂-R₃-R₄-R₅-R₆-R₇-Trp-Gly-

Cys-R₈-R₉-R₁₀-R₁₁-R₁₂-Cys-Y

amely szekvenciában

R₁ jelentése Asp vagy Glu;

R₂ jelentése a Gly, Ala, Pro, Ser, Thr, Asn vagy Gln csoportból választott aminosav;

R₃ jelentése a Gly, Ala, Pro, Ser, Thr, Asp, Glu, Asn, Lys, His, Gln vagy Arg csoportból választott



aminosav;

R₄, R₅, R₆ jelentése egymástól függetlenül bármely aminosav;

R₆ és R₈ jelentése egymástól függetlenül Gly, Ala, Pro, Ser, Thr vagy Asn;

R₇ jelentése a Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Ser, Thr, Asn, Gln, Phe, Tyr, Trp, Cys, Met vagy Pro csoportból választott aminosav;

R₉ és R₁₂ jelentése egymástól függetlenül a Gly, Ala, Leu, Ile, Val, Met, Cys, Phe, Tyr vagy Trp;

R₁₀ jelentése Lys, His vagy Arg; és

X és Y jelentése egymástól függetlenül lehet az, hogy hiányoznak, illetve az, hogy egy vagy több aminosav helyett állnak, azzal a feltétellel, hogy ha jelen vannak, akkor nem képezik, illetve nem képezik részét egyik Humán Immundeficiencia Vírus burokfehérjéje antigén tulajdonságokat mutató részének, azzal jellemezve, hogy az eljárásban a csoportokat önmagukban ismert kémiai, biokémiai vagy rekombináns technikákkal kapcsoljuk egymáshoz, majd a polipeptidet izoláljuk.

33. A 32. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy R₂ jelentése Gln vagy Thr, R₃ jelentése Ser, Asn, Gln, Arg vagy Ala, R₄ jelentése Leu, Ile, Gln vagy Arg, R₅ jelentése lehet Leu, vagy Lys, R₆ jelentése vagy Gly vagy Asn, R₇ jelentése Gly, Ala, Leu, Ile, Val, Met, Cys, Phe, Tyr, Trp vagy Ser, R₈ jelentése Ser vagy Ala, R₉ jelentése Gly vagy Phe, R₁₀ jelentése Arg vagy Lys, R₁₁ jelentése Leu, His, Ile, Gln és R₁₂ jelentése Ala, Ile vagy Val.



34. A 33. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a II általános képlettel leírható szekvenciát tartalmazza:

X-Asp-Gln-R₃-Leu-R₅-Gly-R₇-Trp-Gly-

Cys-Ser-Gly-Lys-R₁₁-R₁₂-Cys-Y,

amely szekvenciában

R₃, R₅, R₁₁, R₁₂, X és Y jelentése ugyanaz, mint amit a 33. igénypontban meghatároztunk; és

R₇ jelentése a Gly, Ala, Leu, Ile, Val, Met, Cys, Phe, Tyr vagy Trp aminosav, és X és Y jelentése ugyanaz, mint amit a 32. igénypontban meghatároztunk.

35. A 34. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy R₃ jelentése Ser, Asn, Gln vagy Arg, R₁₁ jelentése Leu, His vagy Ile, és R₁₂ jelentése Ile vagy Ala.

36. A 35. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy R₇ jelentése Ile, Phe, Met, Val vagy Leu.

37. A 36. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy R₃ jelentése Ser vagy Asn, R₅ jelentése Lys.

38. A 32-37. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a polipeptid az alábbi szekvenciát tartalmazza:

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

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

ahol X és Y jelentése ugyanaz, mint amit a 32. igénypontban meghatároztunk.

39. A 34. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy R₃ jelentése Gln vagy Arg, R₅ jelentése Leu, R₇ jelentése Ile, Phe vagy Met, R₁₁ jelentése Leu, His vagy Ile és R₁₂



jelentése Ala.

40. A 39. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a polipeptid az alábbi szekvenciát tartalmazza:

X-Asp-Gln-Gln-Leu-Leu-Gly-Ile-Trp-
Gly-Cys-Ser-Gly-Lys-Leu-Ala-Cys-Y,

ahol x és Y jelentése ugyanaz, mint amit a 32. igénypontban meghatároztunk.

41. A 33. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a polipeptid lényegében a III általános képlet szerinti aminosav szekvenciát tartalmazza:

X-R₁-R₂-R₃-R₄-R₅-Asn-Ser-Trp-Gly-Cys-Ala-
Phe-Arg-Gln-Val-Cys-Y (III)

ahol R₁ jelentése Glu vagy Asp;

R₂ jelentése Thr vagy Gln;

R₃ jelentése Ser, Asn, Arg, Gln vagy Ala;

R₄ jelentése Leu, Ile, Arg vagy Gln;

R₅ jelentése Lys vagy Leu; és

ahol x és Y jelentése ugyanaz, mint amit a 32.

igénypontban meghatároztunk.

42. A 33. vagy 41. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a polipeptid lényegében IIIa általános képletű aminosav szekvenciát tartalmazza:

X-Glu-Thr-R₃-R₄-Lys-Asn-Ser-Trp-Gly-
Cys-Ala-Phe-Arg-Gln-Val-Cys-Y (IIIa)

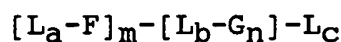
ahol R₃ jelentése Ser, Asn, Arg, Gln vagy Ala, R₄ jelentése Leu, Ile, Arg, vagy Gln, X és Y jelentése ugyanaz, mint amit a 32. igénypontban meghatároztunk.



43. A 42. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy R_3 jelentése Ser, ha R_4 jelentése Ile, vagy R_3 jelentése Ala, ha R_4 jelentése Arg vagy Gln.

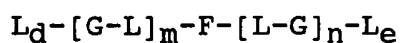
44. Az előző igénypontok bármelyike szerinti szintetikus polipeptid, azzal jellemezve, hogy 10. és 16. pozícióban levő Cys csoportokat intramolekuláris diszulfid híd köti össze.

45. Eljárás a IV általános képletű szintetikus polipeptid,



előállítására, amelyben F és G jelentése egymástól függetlenül a I-IIIa általános képlet szerinti polipeptid, L egy kapcsoló szekvencia, a b és c jelentése egymástól függetlenül 0 vagy 1, m és n jelentése pozitív egész szám, azzal jellemezve, hogy az eljárásban a csoportokat önmagukban ismert kémiai, biokémiai vagy rekombináns technikákkal kapcsoljuk egymáshoz, majd a polipeptidet izoláljuk.

46. Eljárás a (V) általános képletű szintetikus polipeptid,



előállítására, amelyben F jelentése az I-IIIa általános képletű polipeptidek közül bármelyik, G jelentése az I-IIIa általános képletű szekvenciák, vagy más szekvencia szerinti polipeptid, m és n jelentése pozitív egész szám 1 és 10 között, d és e jelentése egymástól függetlenül 0 vagy 1, azzal jellemezve, hogy az eljárásban a csoportokat önmagukban ismert kémiai, biokémiai vagy rekombináns technikákkal kapcsoljuk egymáshoz, majd a polipeptidet izoláljuk.



47. A 32-46. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a polipeptid egy retro-inverz aminosavat tartalmaz.

48. A 32-44. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a polipeptid egy, a 32-44. igénypontok bármelyike szerinti, antigén szempontból jelentős szubfragmentet vagy egy polipeptid variánst tartalmaz.

49. Az előző igénypontok bármelyike szerinti szintetikus polipeptid, azzal jellemezve, hogy legalább egy T-sejt epitópot tartalmaz.

50. A 32-49. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy emellett a polipeptidet még egy vakcina hordozóra kötve tartalmazza.

51. Eljárás egy vakcina előállítására, amelyben legalább egy, a 32-50. igénypontok bármelyike szerinti szintetikus polipeptid található, amely képes elősegíteni legalább egy HIV törzzsel szembeni immunitás kialakulását, és ez a polipeptid egy vagy több gyógyászatilag elfogadható adjuvánst, hordozót és/vagy töltőanyagot tartalmaz.

52. HIV, vagy HIV elleni antitestek kimutatására alkalmas kit, azzal jellemezve, hogy a 32-49. igénypontok bármelyikében definiált szintetikus polipeptidek közül legalább egyet tartalmaz.

53. A 32-49. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy rekombináns DNS technológiát alkalmazunk benne.

54. Gyógyászati készítmény, azzal jellemezve, hogy aktív



adalékanyagként legalább egyet tartalmaz a 32-50. igénypontok bármelyikében leírt polipeptidek közül, egy vagy több gyógyászatilag elfogadható adjuvánssal, hordozóval és/vagy töltőanyaggal együtt.

55. A 32-50. igénypontok bármelyikében leírt szintetikus polipeptid alkalmazása emlős HIV fertőzés terápiás vagy megelőző kezelésére, és/vagy az emlős immunrendszerének serkentésére és/vagy a HIV vírus sejtreceptorainak blokkolására.

56. Eljárás egy antitest vagy ennek egy antigént kötő fragmentjének előállítására, amely specifikusan kötődik egy, a 32-44. igénypontok bármelyike szerinti szintetikus polipeptidhez, azzal jellemezve, hogy az eljárás során egy emlősállatot immunizálunk egy, a 32-51.igénypontok bármelyike szerinti szintetikus polipeptiddel,, majd a keletkező antitestet izoláljuk.

57. Diagnosztikai kit HIV vagy HIV elleni antitestek kimutatására, azzal jellemezve, hogy legalább egy olyan antitestet vagy annak antigén-kötő fragmentjét tartalmazza, amely specifikusan kötődik egy, a 32-44. igénypontok bármelyike szerinti szintetikus polipeptidhez.

58. Eljárás egy gyógyászati készítmény előállítására, azzal jellemezve, hogy aktív adalékanyagként egy olyan antitestet vagy antigén-kötő fragmentet tartalmaz, amely specifikusan kötődik egy, a 32-44. igénypontok bármelyike szerinti szintetikus polipeptidhez, egy vagy több gyógyászatilag elfogadható adjuvánssal, hordozóval és/vagy töltőanyaggal elegyítve.



59. Az 54. vagy 58. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy AZT-t vagy egy HIV proteáz inhibitor kapcsolunk a szintetikus polipeptidhez illetve az antitesthez, vagy annak antigén-kötő fragmentjéhez.

60. Eljárás emlős HIV fertőzés diagnosztizálására, azzal jellemezve, hogy egy emlős szövetmintát vagy testfolyadékot egy antitest, vagy antigén-kötő fragment, amely specifikusan kötődik egy, a 32-44. igénypontok bármelyike szerinti szintetikus polipeptidhez, hatásos mennyiségével inkubáljuk, és meghatározzuk, szükség esetén a mértékét is, hogy az említett minta és az említett antitest között van-e, és ha van, akkor milyen mértékű a keresztreakció.

61. Eljárás HIV vagy HIV elleni antitestek illetve ezek antigén-kötő fragmentjeinek kimutatására, azzal jellemezve, hogy egy mintát legalább egy, a 32-50. igénypontok bármelyike szerinti polipeptiddel inkubáljuk.

A meghatalmazott:

Dr. Willem
Gwala