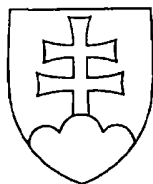


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) SK



ÚRAD  
PRIEMYSELNÉHO  
VLASTNÍCTVA  
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

ZVEREJNENÁ  
PATENTOVÁ PRIHLÁŠKA

- (22) Dátum podania prihlášky: 3. 9. 2001  
(31) Číslo prioritnej prihlášky: 2000 4412  
(32) Dátum podania prioritnej prihlášky: 4. 9. 2000  
(33) Krajina alebo regionálna organizácia priority: NO  
(40) Dátum zverejnenia prihlášky: 11. 9. 2003  
Vestník ÚPV SR č.: 9/2003  
(62) Číslo pôvodnej prihlášky v prípade vylúčenej prihlášky:  
(86) Číslo podania medzinárodnej prihlášky podľa PCT: PCT/NO01/00363  
(87) Číslo zverejnenia medzinárodnej prihlášky podľa PCT: WO02/20555

(11), (21) Číslo dokumentu:

**401-2003**

(13) Druh dokumentu: A3

(51) Int. Cl.<sup>7</sup>:

**C07K 14/16,  
A61K 39/21,  
G01N 33/569**

(71) Prihlasovateľ: **BIONOR IMMUNO AS, Skien, NO;**

(72) Pôvodca: **Sörensen Birger, Skien, NO;**

(74) Zástupca: **ROTT, RŮŽIČKA & GUTTMANN, v. o. s., Bratislava, SK;**

(54) Názov: **Regulačné a pomocné peptidy HIV, antigény, vakcínové kompozície, súprava na imunologickú skúšku a spôsob detekcie protilátok vyvolaných HIV**

(57) Anotácia:  
Sú opísané modifikované peptidy schopné vyvolať HIV-1 špecifickú imunitnú odozvu bez antagonizácie cytotoxickéj aktivity T buniek, aby sa získala účinná profylaktická a terapeutická vakcína proti HIV. Peptidy sú založené na konzervatívnych oblastiach HIV Tat a Rev, regulačných proteínov, a Nef, pomocných proteínov. Opisujú sa voľné antigény alebo antigény viazané na nosiči, ktoré obsahujú aspoň jeden z uvedených peptidov, vakcínové kompozície obsahujúce aspoň jeden z antigénov, súpravy na imunologickú skúšku a spôsob detekcie protilátok vyvolaných HIV alebo HIV – špecifickými peptidmi s použitím takýchto antigénov.

Regulačné a pomocné peptidy HIV, antigény, vakcínové kompozície, súprava na imunologickú skúšku a spôsob detekcie protilátok vyvolaných HIV

### Oblasť techniky

Tento vynález sa týka nových peptidov vychádzajúcich z konzervatívnych oblastí regulačných a pomocných peptidov HIV, antigénov voľných alebo viazaných na nosiči, ktoré obsahujú aspoň jeden z uvedených peptidov, vakcínových kompozícií obsahujúcich aspoň jeden z antigénov, súprav na imunologickú skúšku a spôsobu detekcie protilátok vyvolaných HIV alebo HIV-špecifickými peptidmi s použitím takýchto antigénov.

### Doterajší stav techniky

Ľudský vírus imunitnej nedostatočnosti typu 1 (HIV-1), činiteľ spôsobujúci získaný syndróm imunitnej nedostatočnosti (AIDS), predstavuje stále významné ohrozenie zdravia v rozvojových krajinách. V krajinách Západu majú terapeutické stratégie, ktoré sú zacielené na replikáciu HIV a jeho dozrievanie, významný vplyv na progresiu ochorenia. Vysoké náklady na súčasnú liečbu, vysoká toxicita liekov a nedostatok liečiv však spôsobujú, že vývoj bezpečných a účinných vakcín je naďalej rozhodujúci pre udržanie pandémie AIDS pod kontrolou.

HIV-1 je zložitý retrovírus, ktorý kóduje šesť regulačných a pomocných génov, ktoré sa nenachádzajú v jednoduchých retrovírusoch, menovite *tat*, *rev*, *nef*, *vif*, *vpr* a *vpu* (Tabuľka 1).

V eukaryotických bunkách sa len dokonale skombinované mRNA exportujú do cytoplazmy na transláciu. Neskombinované alebo čiastočne skombinované RNA sa v jadre zadržia a nakoniec sa rozkladajú. Týmto spôsobom prebieha najprv expresia proteínov kódovaných génmi *tat*, *rev* a *nef* (označovaných ako Tat, Rev a Nef) odvodených z viacnásobne skombinovaných druhov RNA a predstavujúcich počiatočnú expresiu génu HIV-1. Na expresiu jednodu-

cho skombinovaných RNA a tiež na prenos genómu neskombinovanej RNA úplnej dĺžky do cytoplazmy na zbalenie si HIV-1 vyvinul prostriedky na prekonanie obmedzení v prenose RNA. Regulačné proteíny Tat a Rev sú kľúčové pri replikácii HIV, pretože mutácie v týchto proteínoch zabraňujú tvorbe HIV-1 (Dayton A.I. a kol. (1986) *Cell*, 44:941-947 a Fisher A.G. a kol. (1986) *Nature*, 320:367-371).

Pomocné gény sú odvodené z exónov umiestnených výlučne v protismere vývoja génu HIV-1, napríklad *vif* alebo exónov v protismere od alebo tiež vo vnútri *env*, ale v rozličných čítacích rámcoch, napr. *tat*, *rev*. Efektívnosť skombinovania sčasti reguluje úrovne génovej expresie rozličných pomocných proteínov.

Po integrácii HIV-1 provírusovej DNA sa syntetizujú prevažne skrátené formy mRNA bunkovou RNA polymerázou II, ktorá interaguje s polohami na 5' dlhom terminálnom opakovaní (LTR) provírusovej DNA. *tat* je jeden z prvých génov, ktorého expresia prebieha a ktorý nesie jadrový lokalizačný signál. Je to účinný aktivátor transkripcie, ktorý zvyšuje transkripciu riadenú LTR až tisíckrát. Nepretržitá expresia Tat zaisťuje kladnú spätnú väzbu pre vysokú úroveň expresie génu. Na rozdiel od bežných aktivátorov transkripcie, ktoré interagujú so sekvenciami DNA, sa Tat viaže priamo na 5' konce všetkých RNA HIV-1 pri zvláštnej sekundárnej štruktúre v tvare slučky TAR (prvku transaktivačnej odozvy). Štruktúra tejto slučky je vysoko konzervatívna a je nevyhnutná pre funkciu Tat. Štruktúra interakcie Tat/TAR sa analyzovala s použitím jadrovej magnetickej rezonancie (NMR) (Puglisi a kol. (1992) *Science*, 257:76-80). Tat viaže TAR v spojení s bunkovým proteínom cyklínom T, ktorý zasa viaže CDK9, ktorý fosforyluje C-terminálnu doménu RNA polymerázy II, čím podporuje predlžovanie transkripcie RNA. Tieto bunkové kofaktory Tat sú prítomné iba v aktivovaných bunkách, ich neprítomnosť potláča transkripciu provírusovej DNA, čím dochádza ku „kvázilatencii“ v T lymfocytoch. Expresia Tat prebieha z dvoch exónov, pričom jadrový lokalizačný signál a väzbová oblasť TAR sú umiestnené v prvom exóne. Infikované bunky vylučujú Tat a tento môže pôsobiť heterológnymi účinkami na susedné bunky. K týmto účinkom patrí bunková aktivácia (Hofman a kol. (1993) *Blood*, 82:2774-2780), vyvolanie bunkovej a

poptózy (Macho a kol. (1999) *Oncogene*, 18:7543-7551), fungovanie ako vylúčiteľný rastový faktor (Trinh, D.P. a kol. (1999) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 256:299-306) a modulovanie syntézy hostiteľského bunkového proteínu v prospech syntézy vírusového proteínu (Xiao a kol. (1998) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 244:384-389). Terapeutické stratégie cieleňé na Tat budú preto mať značný vplyv na infekciu HIV-1.

V počiatočných štádiách po infikovaní majú prevahu malé viacnásobne skombinované mRNA kódujúce Tat, Rev a Nef. Keď sa dosiahne prahová hladina Rev, neskombinované a jednoducho skombinované RNA sa zhromažďujú v cytoplazme na transláciu, čo umožní pokračovanie rozširovania infekcie. Zlyhanie pri tvorení tejto prahovej hladiny Rev môže prispieť k kvázilaticii HIV. Rev sa môže viazať len na tie RNA, ktoré obsahujú zvláštnu RNA štruktúru RRE (prvok odozvy na Rev), ktorá je umiestnená v *env* kódujúcej oblasti génomu. Rev interaguje s RRE ako multimér prostredníctvom zásaditej oblasti bohatej na arginín, ktorá je prítomná v amino terminálnej polovici proteínu. Dôsledkom tejto interakcie je prenos čiastočne skombinovaných RNA, ktoré poskytnú produkty génov, ako sú Env, Vif, Vpu a Vpr, ako aj neskombinovaných RNA, ktoré budú slúžiť ako nové genómy na začlenenie do vytvárajúcich sa častíc. Urobila sa tiež štruktúrna analýza interakcie Rev/RRE s pomocou NMR (Battiste a kol. (1996) *Science*, 273:1547-1551). Rev obsahuje bohatý exportný signál, čo mu umožňuje byť prenášačom pre nepretržitý transport práve syntetizovaných RNA medzi jadrom a cytoplazmou (Kalland a kol. (1994) *J. Virol.*, 68:1475-1485; Meyer & Malim, (1994) *Genes Dev.*, 8:1538-1547). Týmto spôsobom Rev zabezpečuje, že expresia štruktúrnych génov prebieha neskôr, až po regulačných génoch. Terapeutické stratégie nasmerované voči Rev prerušia vo včasnom štádiu infekcie životný cyklus vírusu.

Aj keď bol pôvodne Nef opísaný ako negatívny faktor, neskôr sa ukázalo, že má pozitívne účinky na replikáciu vírusu a jeho expresia prebieha vo väčšom rozsahu ako Tat a Rev na začiatku aj v priebehu infekcie. Nef sa myristyluje na N konci a je spojený s vnútornou stranou plazmovej membrány. Nef je sčasti zodpovedný za reguláciu znižovaním a za rozklad povrchovej CD4 endocytózou (Piguet a kol. (1998) *EMBO J.*, 17:2472-2481). Odstránenie CD4 z povrchu

bunky zabraňuje superinfekcii inými kmeňmi HIV-1 alebo opätovnej infekcii práve uvoľneným vírusom. Nef je tiež zodpovedný za reguláciu znižovaním MHC triedy I, čím ochraňuje infikované bunky pred deštrukciou cytotoxickými lymfocytmi T (Le Gall a kol. (1997) Res. Virol., 148:43-47). Nef nie je kľúčovým proteínom vírusu, pretože nie je potrebný pre infekciu *in vitro* lymfocytov periférnej krvi alebo bunkových línií T. Delečné mutanty Nef sú však v dlhších časových obdobiach menej patogénne. Nef má tiež zložité vplyvy na prenosové cesty signálu v bunke a obsahuje oblasti bohaté na prolín, ktoré môžu interagovať s doménou SH3 kináz zúčastňujúcich sa na aktivácii buniek T, čo je vlastnosť potrebná na účinnú replikáciu HIV (Moarefi a kol. (1997) Nature, 385:650-653). Vírusy obsahujúce Nef sú schopné syntetizovať viac vírusovej DNA než vírusy s vynechaným génom Nef, čo naznačuje, že Nef priamo alebo nepriamo aktivuje reverzné transkriptázy vírusu. Za tento jav môže byť zodpovedná nízka hladina Nef spojená s viriónmi. Nízke hladiny Nef sa uvoľňujú aj z infikovaných buniek, hoci potenciálny účinok susedných buniek je nejasný. Pretože expresia Nef prebieha na začiatku infekcie a má výrazné účinky na expresiu CD4 a MHC triedy I, ako aj na progresiu choroby, predstavuje Nef dôležitý cieľ pre budúce terapeutické stratégie.

Tat a Nef sa vylučujú a môžu byť prijímané makrofágmi a ich expresia môže prebiehať v spojení s molekulami MHC triedy II. To zvyšuje ich stabilitu ako cieľov pre terapie na báze peptidov, ktorých expresia by tiež mohla prebiehať v súvislosti s MHC triedy II. Je jasné, že zameranie sa na počiatočné génové produkty, ktoré sú kľúčové pri replikácii HIV-1, ako sú Tat a Rev, by malo dostať prednosť rovnako ako Nef, ktorého expresia prebieha tiež na začiatku a ovplyvňuje progresiu choroby.

Tabuľka 1 Regulačné a pomocné proteíny HIV-1

Gén	Proteín	Názov	Expresia	Umiestnenie	Funkcie
<i>Tat</i>	Tat	Transaktívátor transkripcie vírusu	Počiatočná	Jadro	Aktivuje transkripciu vírusu. Vylučovaný z infikovaných buniek, kde môže aktivovať T bunky, indukovať apoptózu a pôsobí ako rastový faktor
<i>Rev</i>	Rev	Exportný faktor jadrovej RNA	Počiatočná	Jadierko, nukleoplazma, cytoplazma	Riadi spletie/prenos RNA do cytoplazmy. Prenášací proteín.
<i>Nef</i>	Nef	Rozličné efektorové funkcie	Počiatočná	Cytoplazma, virióny spojené s membránami	Spúšťa endocytózu CD4. Reguluje znižovaním expresiu MHC triedy 1. Viaže sa na kinázy a môže ovplyvňovať signalizáciu a aktiváciu T buniek.
<i>Vpu</i>	Vpu	Vírusový proteín u	Neskoršia	Cytoplazma, spojená s membránami	Spúšťa vnútrobunkový rozklad CD4, reguluje znižovaním MHC triedy 1, nešpecifický urýchľovač uvoľňovania retrovírusových častíc.
<i>Vif</i>	Vif	Faktor infekčnosti vírusu	Neskoršia	Cytoplazma, membránové virióny	Zvyšuje infekčnosť vírusových častíc bunkovo závislým spôsobom. Zlepšuje syntézu vírusovej DNA počas spätnej transkripcie.
<i>Vpr</i>	Vpr	Vírusový proteín r	Neskoršia	Hlavne virióny jadra	Prispieva k jadrovému importu predintegračného komplexu. Zastavuje bunky vo fáze G2/M bunkového cyklu.

Prirodzene sa vyskytujúce sekvencie HIV v kandidátoch na vakcínu nie sú schopné stimulovať stabilnú a dlhotrvajúcu imunitnú odozvu kvôli vnútornej schopnosti HIV ukryť sa pre imunitný systém zmenou vzhľadu prítomných epitopov. Na prekonanie tohto premenlivého vzhľadu epitopov budú niektoré substitúcie aminokyselín a kombinácie aminokyselín podporovať imunitný

system v objavení a rozpoznávání těchto antigenů cudzieho vírusu spoľahlivým spôsobom, a preto aj vo väčšej miere.

Na základe vyššie uvedených známych faktov sme sa rozhodli preskúmať možnosť vytvorenia nových syntetických peptidov, ktoré môžu napodobňovať epitopy z regulačných a pomocných proteínov HIV takým spôsobom, že môžu byť prístupné pre humorálnu ako aj bunkovú časť imunitného systému, a splňali by požiadavky na účinnú terapeutickú a/alebo profylaktickú vakcínu.

Počiatkové práce vychádzali z prirodzených sekvencií aminokyselín Tat publikovaných Korberom a kol., *Human Retroviruses and AIDS* (Ľudské retrovírusy a AIDS), 1997, Red. Theoretical Biology and Biophysics Group, Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, NM. Prvý epitop Tat je umiestnený medzi aminokyselinou 1 a aminokyselinou 24 proteínu tat:

Tabuľka 2. Epitop Tat

Čís. AK	Prirodzene sa vyskytujúce aminokyseliny							
1	M	S						
2	E	D	V					
3	S	Q	P	L	V	A		
4	V	I						
5	D	N						
6	P	H	A					
7	R	N	S	K	E	D		
8	L	I	Q	R	V	M	T	
9	E	D	P					
10	P	S						
11	W							
12	K	N	E	H	L			
13	H	R	Q					
14	P							
15	G	P						
16	S	N	A					
17	Q	K	T					
18	P	H						
19	K	T	S	A	R	P	E	Q
20	T	A	I					
21	A	P	D	V				
22	C	S						
23	T	N	S					
24	N	K	R	Q	A	P	T	

Jednopísmenové, rovnako ako trojpísmenové kódy definujúce aminokyseliny v sekvenciách uvedených v tejto špecifikácii sú v súlade s medzinárodnými normami a sú uvedené v učebniciach, napríklad Lehninger A.L., „Principles of Biochemistry“ (Základy biochémie), Worth Publishers Inc., New York, 1982. Aminokyseliny uvedené napravo od ľavého stĺpca predstavujú prirodzené varianty sekvencie. Naše analýzy viedli k sekvencii obsahujúcej tento modifikovaný epitop:

C S W V N P R L E P W L H P G S Q P N I T A C T N

|-----|

v ktorom NI označuje kyselinu 2-aminohexánovú (norleucín, v skratke Nle v trojpísmenovom resp. NI v jednopísmenovom kóde) a cysteínové zvyšky sú v oxidovanom stave, t.j. vytvárajú vnútroreťazcovú disulfidickú väzbu. Pretože cysteínový zvyšok v C-koncovej časti (v polohe 22) peptidu je časťou intramolekulovej disulfidickej väzby mimo tohto zvoleného epitopu, podobná intrapeptidová disulfidická väzba sa vytvorí umiestnením cysteínu do N-koncovej časti zvoleného epitopu. Inou možnosťou je vytvorenie intermolekulovej disulfidickej väzby dimerizáciou sekvencií:

W V N P R L E P W L H P G S Q P N I T A C T N

|

W V N P R L E P W L H P G S Q P N I T A C T N

Ďalšou možnosťou je dimerizácia s iným vybraným epitopom z Tat. Druhý epitop na Tat je umiestnený medzi aminokyselinami 35 a 57 v smere C-konca a je oddelený od prvého epitopu 10 aminokyselinami obsahujúcimi ďalších 5 Cys zvyškov, okrem Cys zvyškov v každom z epitopov. Pomerne veľký počet Cys zvyškov ponúka veľa možností medzimolekulových a vnútramolekulových prepojení. Je pravdepodobné, že táto doména bohatá na Cys bude dominovať v imunologickej expozícii tohto proteínu a tým zabezpečí „ukrytie“ dvoch relevantných epitopov. Výber a modifikácia týchto dvoch susedných epitopov môže sprístupniť kľúčovú časť proteínu Tat optimálnejším spôsobom.

Aby sa obmedzila pravdepodobnosť vývoja únikových mutantov, počet epitopov sa ďalej zvýšil a vybrali sa dve ďalšie sekvencie peptidov. Tieto sekvencie sú umiestnené na Rev (zvyšky 58-78) a Nef (zvyšky 65-85). Prirodzené sekvencie sa publikovali v knihe *Human Retroviruses and AIDS 1999; A Compilation and Analysis of Nucleic Acid and Amino Acid Sequences* (Ľudské retrovírusy a AIDS, 1999; Prehľad a analýzy sekvencií nukleových kyselín a aminokyselín). Red. Theoretical Biology and Biophysics Group, Los Alamos Laboratory, Los Alamos:

Tabuľka 3. Epitop Tat

Čís. AK	Prirodzene sa vyskytujúce aminokyseliny						
35	Q	P	I	L	T	Y	V
36	V	A	C	L			
37	C						
38	F						
39	I	L	Q	M	T		
40	T	N	K	R			
41	K	Q					
42	G	A					
43	L						
44	G	S					
45	I						
46	S	F	Y				
47	Y	N					
48	G						
49	R	K	S				
50	K						
51	K						
52	R						
53	R	K	S	G			
54	Q	R	P				
55	R						
56	R						
57	R	G	S				

Tabuľka 4. Epitop Rev

Čís. AK	Prirodzene sa vyskytujúce aminokyseliny									
58	R	W	Q							
89	I	V	L	F						
60	L	I	P							
61	G	S	N	D	C	V	T	A	R	
62	T	A	D	N	S					
63	Y	C	F	R	H	S	V	L		
64	L	V								
65	G	H								
66	R	G								
67	S	P	F	L						
68	A	T	E	Q	V	P	S			
69	E	K	Q	D	N					
70	P	S	A	N						
71	V	N	G	P						
72	P	Q	H	S	L	R	T	D	I	
73	L	F	V							
74	Q	L	P	H	D	E				
75	L									
76	P									
77	P	L	E							
78	L	I	V	P						

a

Tabuľka 5. Epitop Nef

Čís. AK	Prirodzene sa vyskytujúce aminokyseliny									
65	E	G	D	S						
66	N	G	D	E						
67	E	V								
68	A	G								
69	L	F								
70	P									
71	I	V								
72	T	R	K	A	M					
73	P									
74	Q	H								
75	V	L	I							
76	P									
77	L	V	T							
78	R									
79	P									
80	M	V	I							
81	T	D								
82	Y	F	R							
83	K	R								
84	A	G	S	E	Q					
85	A	S	V							

Niekoľko modifikovaných peptidov sa syntetizovalo na to, aby sa stanovila jedinečnosť sekvencií ako aj ich vlastností stimulácie imunitného systému v kombinácii s ich špecificitou a citlivosťou ako antigénov HIV-1.

### Podstata vynálezu

Peptidy podľa tohto vynálezu pochádzajú zo štyroch rozličných konzervatívnych oblastí proteínov Tat, Rev a Nef HIV-1, ktoré sú opísané vyššie a ktoré majú vlastnosti uchovávajúce jedinečnosť (imunogenicitu, citlivosť a špecificitu) epitopov HIV-1. Nové peptidy podľa tohto vynálezu ďalej nemajú pozorovateľný cytotoxický antagonistický účinok na T lymfocyty (CTL) a musia mať aspoň jeden potenciálny CTL epitop.

Peptidy podľa tohto vynálezu, ktoré spĺňali nasledujúce kritériá, sú vybraté z nasledujúcich skupín:

Xaa<sub>1</sub> Xaa<sub>2</sub> Xaa<sub>3</sub> Xaa<sub>4</sub> Xaa<sub>5</sub> Xaa<sub>6</sub> Xaa<sub>7</sub> Leu Glu Pro Trp Xaa<sub>12</sub> His Pro Xaa<sub>15</sub>  
Xaa<sub>16</sub> Xaa<sub>17</sub> Xaa<sub>18</sub> Xaa<sub>19</sub> Xaa<sub>20</sub> Xaa<sub>21</sub> Xaa<sub>22</sub> Xaa<sub>23</sub> Xaa<sub>24</sub> (SEQ ID NO: 1),

kde aminokyseliny reťazca môžu mať nasledujúci význam;

Xaa v polohe 1 derivátu peptidu je Met, Ser, Cys alebo nič,

Xaa v polohe 2 je Glu, Asp, Val, Ser alebo nič,

Xaa v polohe 3 je Ser, Gln, Pro, Leu, Val, Ala, Trp, Tyr alebo Phe,

Xaa v polohe 4 je Val alebo Ile,

Xaa v polohe 5 je Asp, Asn alebo Ile,

Xaa v polohe 6 je Pro, His alebo Ala,

Xaa v polohe 7 je Arg, Asn, Ser, Lys, Glu alebo Asp,

Xaa v polohe 12 je Leu, Ile alebo Nle,

Xaa v polohe 15 je Gly alebo Pro,

Xaa v polohe 16 je Ser, Asn alebo Ala,

Xaa v polohe 17 je Gln, Lys alebo Thr,

Xaa v polohe 18 je Pro alebo His,

Xaa v polohe 19 je Lys, Thr, Ser, Ala, Arg, Pro, Glu, Leu, Ile alebo Nle,

Xaa v polohe 20 je Thr, Ala alebo Ile,

Xaa v polohe 21 je Ala, Pro, Asp alebo Val,

Xaa v polohe 22 je Cys alebo Ser,

Xaa v polohe 23 je Thr, Asn alebo Ser,

Xaa v polohe 24 je Asn, Lys, Arg, Gln, Ala, Pro alebo Thr,

peptid obsahuje aspoň šesť po sebe idúcich aminokyselín sekvencie SEQ ID NO: 1,

okrem toho dva alebo viac Cys zvyškov môžu vytvárať časť vnútroreťazcovej alebo medzireťazcovej disulfidickej väzby, mostík  $-S-(CH_2)_p-S-$  alebo  $-(CH_2)_p-$ , kde  $p = 1-8$ , prípadne s vloženým jedným alebo viacerými heteroatómami, ako je O, N alebo S,

Xaa<sub>1</sub> Xaa<sub>2</sub> Xaa<sub>3</sub> Phe Xaa<sub>5</sub> Xaa<sub>6</sub> Xaa<sub>7</sub> Xaa<sub>8</sub> Xaa<sub>9</sub> Xaa<sub>10</sub> Xaa<sub>11</sub> Xaa<sub>12</sub> -Z- Tyr Xaa<sub>i</sub> Gly Xaa<sub>15</sub> Lys Lys Arg Xaa<sub>19</sub> Xaa<sub>20</sub> Xaa<sub>21</sub> Xaa<sub>22</sub> Xaa<sub>23</sub> (SEQ ID NO: 4),

kde aminokyseliny reťazca majú nasledujúci význam;

Xaa v polohe 1 je Pro, Ile, Leu, Thr, Tyr alebo Val,

Xaa v polohe 2 je Val, Ala, Cys, Leu,

Xaa v polohe 3 je Cys, Ile, Leu, Val alebo Nle,

Xaa v polohe 5 je Ile, Leu, Gln, Met alebo Thr,

Xaa v polohe 6 je Thr, Asn, Lys alebo Arg,

Xaa v polohe 7 je Lys, Arg alebo Gln,

Xaa v polohe 8 je Gly alebo Ala,

Xaa v polohe 9 je Leu alebo Ile,

Xaa v polohe 10 je Gly, Ser alebo Ala,

Xaa v polohe 11 je Ile alebo Gly,

Xaa v polohe 12 je Ser, Phe alebo Tyr,

Xaa<sub>i</sub> vložená pred polohou 14 je Leu, Ile, Nle,

Xaa v polohe 15 je Arg, Lys, Ser alebo citrulín (Cit),

Xaa v polohe 19 je Arg, Lys, Ser, Gly alebo Cit,

Xaa v polohe 20 je Gln, Arg alebo Pro,

Xaa v polohe 21 je Ile alebo Leu,

Xaa v polohe 22 je Gly, Leu, Ile, Cys alebo nič,

Xaa v polohe 23 je Gly alebo nič,

kde sekvencia SEQ ID NO: 4 obsahuje aspoň šesť po sebe idúcich aminokyselín, -Z- je možný spoj a predstavuje PEG, modifikovaný PEG a/alebo [Gly]<sub>n</sub>, v ktorom n = 1,2 alebo 3,

okrem toho dva alebo viac Cys zvyškov môže vytvárať časť vnútroreťazcovej alebo medzireťazcovej disulfidickej väzby, mostík -S-(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>-S- alebo -(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>-, kde p = 1-8, prípadne s vloženým jedným alebo viacerými heteroatómami, ako je O, N alebo S,

Xaa<sub>1</sub> Ile Leu Xaa<sub>4</sub> Xaa<sub>5</sub> Xaa<sub>6</sub> Leu Gly Arg Xaa<sub>10</sub> Xaa<sub>11</sub> -Z- Xaa<sub>12</sub> Leu Xaa<sub>i</sub> Xaa<sub>i</sub> Xaa<sub>14</sub> Xaa<sub>15</sub> Xaa<sub>16</sub> Xaa<sub>17</sub> Xaa<sub>18</sub> Xaa<sub>19</sub> Leu Pro Pro Leu (SEQ ID NO: 7),

kde Xaa v polohe 1 je Phe, Tyr, Trp alebo Arg,

Xaa v polohe 4 je Gly, Ser, Asn, Asp, Cys, Val, Thr, Ala alebo Arg,

Xaa v polohe 5 je Thr, Ala, Asp, Asn alebo Ser,

Xaa v polohe 6 je Tyr, Cys, Phe, Arg, His, Ser, Val alebo Leu,

Xaa v polohe 10 je Ser, Pro, Phe, Leu alebo Ile,

Xaa v polohe 11 je Ala, Thr, Glu, Gln, Val, Pro alebo Ser,

Xaa v polohe 12 je Glu, Lys, Gln, Asp, Asn, Tyr, Trp alebo Phe,

Xaa<sub>i</sub> vložená za polohou 13 je Ser, Pro, Phe, Leu alebo Ile,

Xaa<sub>i</sub> vložená pred polohou 14 je Ala, Thr, Glu, Gln, Val, Pro alebo Ser,

Xaa v polohe 14 je Glu, Lys, Gln, Asp alebo Asn,

Xaa v polohe 15 je Pro, Ser, Ala alebo Asn,

Xaa v polohe 16 je Val, Asn, Gly alebo Pro,

Xaa v polohe 17 je Pro, Gln, His, Ser, Leu, Arg, Thr, Asp alebo Ile,

Xaa v polohe 18 je Leu, Phe alebo Val,

Xaa v polohe 19 je Gln, Leu, Pro, His, Asp alebo Glu,

kde sekvencia SEQ ID NO: 7 obsahuje aspoň šesť po sebe idúcich aminokyselín, spojka -Z- je dobrovoľná a predstavuje PEG, modifikovaný PEG a/alebo [Gly]<sub>n</sub>, v ktorom n = 1,2 alebo 3,

Xaa<sub>1</sub> Leu Val Gly Xaa<sub>5</sub> Pro Xaa<sub>7</sub> Xaa<sub>8</sub> Pro Xaa<sub>10</sub> Xaa<sub>11</sub> Pro -Z- [Arg]<sub>m</sub> Xaa<sub>i</sub>  
Xaa<sub>13</sub> Xaa<sub>14</sub> Pro Xaa<sub>16</sub> Xaa<sub>17</sub> Xaa<sub>18</sub> Xaa<sub>19</sub> Xaa<sub>20</sub> Xaa<sub>21</sub> (SEQ ID NO: 10),

kde Xaa v polohe 1 je Lys alebo Arg,

Xaa v polohe 5 je Phe alebo Leu,

Xaa v polohe 7 je Ile alebo Val,

Xaa v polohe 8 je Thr, Arg, Lys, Ala alebo Met,

Xaa v polohe 10 je Gln alebo His,

Xaa v polohe 11 je Val, Leu alebo Ile,

Xaa<sub>i</sub> vložená pred polohou 13 je Leu,

Xaa v polohe 13 je Leu, Val alebo Thr,

Xaa v polohe 14 je Arg alebo citrulín (Cit),

Xaa v polohe 16 je Met, Val, Ile alebo Nle, Leu,

Xaa v polohe 17 je Thr alebo Asp,

Xaa v polohe 18 je Tyr, Phe alebo Arg,

Xaa v polohe 19 je Lys alebo Arg,

Xaa v polohe 20 je Ala, Gly, Ser, Glu alebo Gln,

Xaa v polohe 21 je Ala, Ser alebo Val,

kde sekvencia SEQ ID NO: 10 obsahuje aspoň šesť po sebe idúcich aminokyselín, spojka -Z- je dobrovoľná a predstavuje PEG, modifikovaný PEG a/alebo [Gly]<sub>n</sub>, v ktorom n = 1,2 alebo 3 a nezávisle od n je m v [Arg]<sub>m</sub> rovné 0, 1, 2 alebo 3,

terminálnymi ukončeniami sekvencií môžu byť voľné karboxylové skupiny alebo aminoskupiny, amidy, acyly, acetyly alebo ich soli a/alebo sú uvedené sekvencie peptidov imobilizované na pevnom nosiči.

Nové sekvencie peptidov majú schopnosť slúžiť ako dobrý antigén, v ktorom antigén obsahuje aspoň jeden peptid vybraný zo skupiny sekvencií SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 7 alebo SEQ ID NO: 10. Antigeni-

cita sa môže upravovať zmenou pomeru koncentrácií rozličných peptidov alebo veľkosti peptidov napríklad dimerizáciou alebo polymerizáciou a/alebo imobilizáciou na tuhej fáze. Antigén obsahuje dve alebo viac sekvencií polypeptidov podľa tohto vynálezu, ktoré by mohli byť buď spojené mostíkom, napríklad disulfidickým mostíkom medzi Cys zvyškami reťazcov alebo mostíkmi ako je  $C_1-C_8$  alkylén, prípadne s vloženým jedným alebo viacerými heteroatómami, ako sú O, S alebo N, alebo sú výhodne nespojené. Reťazce môžu byť imobilizované na tuhej fáze v monomérskej, dimérskej alebo oligomérskej forme. Ku koncom sa môžu pridať ďalšie aminokyseliny, aby vzniklo «rameno» na uľahčenie imobilizácie.

PEG je polyetylén glykol ( $HO(CH_2CH_2O)_a H$ ) a môže byť časťou spojky -Z-, prípadne je PEG modifikovaný dikarboxylovou skupinou ( $HO(CH_2CH_2O)_a CO(CH_2)_b COOH$ ) alebo koncovou karboxylovou skupinou ( $HO(CH_2CH_2O)_{a-1} CH_2COOH$ ), kde pred spojením  $a = 1-10$  a  $b = 2-6$ .

Spojka -Z- môže byť tvorená buď PEG, modifikovaným PEG alebo ich kombináciou a/alebo kombináciou jedného alebo viacerých Gly zvyškov. Spojka -Z- môže byť tiež tvorená Gly-mostíkom  $[Gly]_n$ , v ktorom  $n = 1, 2$  alebo 3.

Všetky aminokyseliny v peptidoch podľa tohto vynálezu môžu byť v D-forme alebo v L-forme, hoci prirodzene sa vyskytujúca L-forma je výhodnejšia.

C- a N-terminálne ukončenia sekvencií peptidov sa môžu odlišovať od prírodných sekvencií modifikáciou terminálnych  $NH_2$  skupín a/alebo  $COOH$  skupín, môžu byť napríklad acylované, acetylované, amidované alebo modifikované tak, že poskytujú miesto naviazania pre nosič alebo inú molekulu.

Peptidy podľa tohto vynálezu pozostávajú zo 6 až 50 aminokyselín, výhodne z 10 až 30 aminokyselín. Tieto predstavujú celú prírodnú paletu aminokyselín v identifikovaných polohách.

Polypeptidový antigén podľa tohto vynálezu je buď voľný alebo vo forme viazanej na nosiči. Nosič alebo tuhá fáza, na ktorú je peptid prípadne naviazaný, sa môže vybrať zo širokej palety známych nosičov. Mal by byť vybraný s

ohľadom na zamýšľané použitie imobilizovaného polypeptidu ako diagnostického antigénu alebo ako imunizačnej zložky vo vakcíne.

Príkladmi nosičov, ktoré sa môžu použiť napríklad na diagnostické účely, sú magnetické guľičky alebo živica z kopolymérov, ako je styrén-divinylbenzén, hydroxylovaný styrén-divinylbenzén, polystyrén, karboxylovaný polystyrén, guľôčky z uhlíkovej čierne, neaktivované alebo polystyrénom alebo polyvinylchloridom aktivované sklo, epoxidom aktivované porózne magnetické sklo, želatínové alebo polysacharidové častice alebo iné proteínové častice, červené krvinky, monoklonálne a polyklonálne protilátky alebo fab fragmenty týchto protilátok.

Podľa ďalšieho praktického uskutočnenia tohto vynálezu môžu byť antigény súčasťou vakcíny s možnosťou kombinácie s nosičmi, adjuvantmi alebo s inými imunostimulačnými prvkami, ako je vírus kiahní obsahujúci *env* gén. Príkladmi nosičov a/alebo adjuvantov na účely vakcíny sú iné proteíny, ako je ľudský alebo hovädzí sérový albumín, limpetový hemocyanín a mastné kyseliny. Imunostimulačné materiály sa dajú rozdeliť do troch skupín: adjuvanty, nosiče pre antigény a vehikulá. Príkladmi adjuvantov sú hydroxid hlinitý, hlinité soli, saponín, muramyl di- a tripeptidy, monofosforyllipid A, kyselina palmitová, *B.pertussis* a rozličné cytokíny zahŕňajúce Th1 cytokín IL-12 a IL-1. Rad proteínových toxínov, ktoré sú užitočné pri vývoji CTL vakcín, sa môže použiť na dopravu prenášačových proteínov cez bunkové membrány do cytosolu. K nosičom patria bakteriálne toxoidy, ako je inaktivovaný toxín tetanu a cholery, geneticky detoxifikované bakteriálne toxíny, ako je teplotne labilný enterotoxín z *E.coli*, mastné kyseliny, živé vektory, ako je polio chimera, a hybridné proteíny, ktoré tvoria častice, napríklad častice kvasinkového retrotranspozónového hybridu TY a častice HBcAg. Vehikulá, ktoré sú často sa vyskytujúcimi zložkami v moderných vakcínach, obsahujú emulzie minerálnych olejov, Freundov úplný a neúplný adjuvant, emulzie rastlinných olejov, povrchovo aktívne látky na báze neiónových blokových kopolymérov, skvalén alebo skvalán, lipopeptidy, lipozómy a biologicky odbúrateľné mikroguľôčky. Dvoma novými adjuvantami, ktoré sú významné pri vývoji nových vakcín, sú mikroemulzia olej vo vode (MF59) a polymérne mikročastice. Môže sa použiť akákoľvek látka,

ktorá môže zvýšiť imunogenicitu antigénu, a niektoré ďalšie alternatívy nosičov alebo adjuvantov sú uvedené v americkom alebo v európskom liekopise.

Vhodný prípravok obsahujúci antigén na imunostimulačné použitie môže tiež obsahovať interferóny, ako je INF- $\gamma$ , antivírusové chemokíny alebo hematopoetické rastové faktory, ako je rastový faktor granulocytov-makrofágov.

Iným priblížením, ktorého cieľom je zvýšiť stimuláciu a absorpciu, napríklad v črevách, je podanie peptidov podľa tohto vynálezu s malými peptidmi, ako sú di-, tri- alebo tetrapeptidy. Tieto peptidy sa môžu podávať navyše alebo v kombinácii s peptidmi podľa tohto vynálezu. Výhodne sa tieto peptidy podávajú spolu s tripeptidom YGG, ktorý pozostáva z aminokyselín v D-forme alebo v L-forme, výhodne v D-forme.

Nedávne prístupy k neparenterálnemu podávaniu vakcíny, napríklad cez sliznicu, zahŕňajú: technológiu génovej fúzie na vytvorenie netoxických derivátov sliznicových adjuvantov, geneticky inaktivované antigény s deléciou v esenciálnom géne, koexpresiu antigénu a špecifického cytokínu, ktorý je dôležitý pri modulácii a riadení sliznicovej imunitnej odozvy, a samotný genetický materiál, ktorý by umožnil prijatie DNA alebo RNA a jeho endogénnu expresiu v hostiteľských bunkách.

Jedným prístupom k vývoju trvanlivých odoziev, keď sa vyžaduje bunkami sprostredkovaná imunita, je vakcinácia s plazmidom DNA kódujúcim jeden alebo viac špecifických antigénov.

Na ochranu proti infekcii HIV musia vakcíny vykazovať sliznicovú aj systémovú imunitnú odozvu a mali by sa podávať akýmkoľvek konvenčným spôsobom, napríklad parenterálne alebo neparenterálne, ako je napríklad subkutánne, intrakutánne, intravenózne, intramuskulárne, perorálne, mukoticky alebo intranazálne.

Vo výhodnom praktickom uskutočnení vakcína podľa tohto vynálezu obsahuje antigény obsahujúce peptidy vybraté z aspoň jednej zo skupín SEQ ID NO: 1, 4, 7 a 10, výhodnejšie sa peptidy vyskytujú v rovnakých množstvách.

V ďalšom praktickom uskutočnení vakcína obsahuje antigény:

F V I H R L E P W L H P G S Q H N I T A S T N - NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 14)

a

R L V G F P V K P Q V P G L L R P L T Y K A A - NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 15).

Tieto sekvencie môžu aktivovať bunkový imunitný systém a spolupracuje s CTL-epitopmi. Zmeny v aminokyselinách zabudované v rámci CTL-epitopov sú navrhnuté tak, aby sa dosiahlo zlepšenie viazania. Vykonali sa aj ďalšie zmeny v aminokyselinách, aby sa uľahčila syntéza peptidu a/alebo sa zvýšila rozpustnosť peptidu.

Ďalším praktickým uskutočnením vynálezu je spôsob detekcie protilátok vyvolaných HIV-1 alebo HIV-1-špecifickými peptidmi alebo proteínmi vo vzorke telovej tekutiny pomocou uvedených antigénov. Tento vynález zahŕňa aj súpravu na imunologickú skúšku pre uvedenú detekciu a protilátky schopné selektívne reagovať s uvedenými antigénmi.

#### Opis prípravy peptidov

Peptidy podľa tohto vynálezu sa môžu pripraviť akoukoľvek známou metódou prípravy lineárnej sekvencie aminokyselín, ako sú rekombinantné DNA techniky. Sekvencia nukleových kyselín, ktorá kóduje jeden alebo viac peptid podľa tohto vynálezu alebo multimér uvedených peptidov sa zavedie do expresného vektora. Vhodnými expresnými vektormi sú napríklad plazmidy, kozmidy, vírusy a YAC (kvasinkové umelé chromozómy), ktoré obsahujú potrebné kontrolné oblasti pre replikáciu a expresiu. Expresný vektor môže byť stimulovaný na expresiu v hostiteľskej bunke. Vhodnými hostiteľskými bunkami sú napríklad baktérie, bunky kvasiniek a bunky cicavcov. Takéto techniky sú dobre známe odborníkom v problematike a sú opísané napríklad Sambrookom a kol., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Molekulárne klonovanie: Laboratórna príručka), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1989. Inými dobre známymi technikami sú degradácia alebo syntéza pri-

pojením aminokyselinového zvyšku k ďalšiemu zvyšku v kvapalnej fáze alebo výhodne na tuhej fáze (živica), napríklad takzvanou Merrifieldovou syntézou. Pozri napríklad Barany a Merrifield v knihe *Peptides, Analysis, Synthesis, Biology* (Peptidy, analýza, syntéza, biológia), zv. 2, red. E. Gross a Meinhofer (Acad. Press, N.Y., 1980), Kneib-Coronier a Mullen, *Int. J. Peptid Res.*, 30, s. 705-739 (1987) a Fields a Noble, *Int. J. Peptid Protein Res.* 35, s.161-214 (1990).

V prípade, že sa požaduje lineárny alebo cyklický peptid, na sekvencii aminokyselín sa vykoná krok chemickej oxidácie, aby sa pri syntetizovaní vhodných sekvencií lineárnych aminokyselín cyklizovali alebo spojili dva cysteínové zvyšky v rámci jednej alebo medzi dvoma sekvenciami peptidov, pozri Akaji a kol., *Tetrahedron Letter*, 33, 8, s. 1073-1076, 1992.

#### Všeobecný opis syntézy

Všetky deriváty peptidov pripravené v príkladoch uvedených nižšie sa syntetizovali na syntezátore peptidov Milligen 9050 s použitím štandardného programu. Použitá živica bola Tenta Gel P RAM s teoretickým plnením 0,20 meq/g (RAPP POLYMERE GmbH, Tübingen). Konečný produkt syntézy sa vysušil cez noc vo vákuu. Peptid sa potom oddelil od živice pôsobením 90 % kyseliny trifluóroctovej v prítomnosti etánditiolu (5 %) a vody (5 %) ako lapačov nečistôt (1,5 hodiny pri teplote miestnosti). Potom sa živica odfiltrovala a premyla na filtri ďalšou dávkou kyseliny trifluóroctovej (100 %) (2 × 20 ml). Spojené filtráty sa odparili vo vákuu (vodný kúpeľ pri teplote miestnosti) a zvyšok sa zmiešal s etyléterom (200 ml) a vyzrážaný produkt sa odfiltroval. Tuhá látka sa ihneď rozpustila na filtri v ľadovej kyseline octovej (100 ml), pridala sa k 1,5 l 20 % kyseliny octovej v metanole a na zmes sa pôsobilo 0,1 M roztokom jódu v metanole, až sústava získala svetlohnedú farbu. Potom sa pridal iónomenič Dowex 1 × 8 vo forme acetátu (15 g) (Bio-Rad, Richmond, CA, USA) a zmes sa prefiltrovala. Filtrát sa odparil a zvyšok sa lyofilizoval z kyseliny octovej. Produkt sa potom prečistil kvapalinovou chromatografiou s obrátenými fázami na stĺpci s Kromasilom® 100 - 5 C8 (EKA Nobel, Surte,

Švédsko) vo vhodnom systéme obsahujúcom acetonitril v 0,1 % vodnom roztoku kyseliny trifluóroctovej. Vzorky odobraté zo stĺpca sa analyzovali analytickou vysokoúčinnou kvapalinovou chromatografiou (HPLC) (Beckman System Gold, USA) na stĺpci Kromasilu® 100 - 5 C8 (EKA Nobel, Surte, Švédsko). Frakcie obsahujúce čistú látku sa spojili, rozpúšťadlo sa odparilo a produkt sa lyofilizoval z kyseliny octovej. Na výslednom produkte sa urobila záverečná analýza HPLC a štruktúra peptidu sa potvrdila analýzou aminokyselín a hmotnostnou spektrometriou (LDI-MS).

Všetky aminokyseliny použité v syntéze boli L-aminokyseliny a ich funkčná  $\alpha$ -aminoskupina bola chránená fluorenylmetoxykarbonylovou skupinou. Bočné reťazce boli chránené nasledujúcim spôsobom:

Cys (Trt), Gln(Trt), Glu(OtBu), Thr(tBu).

Skratky v zátvorkách znamenajú:

Trt = trifenylmetyl,

t-Bu = *terc*-butyl,

OtBu = *terc*-butylester.

Deriváty aminokyselín dodala firma Bachem AG, Švajčiarsko.

### Príklady uskutočnenia vynálezu

#### PRÍKLAD 1

Príprava C S W V N P R L E P W N I H P G S Q H N I T A C T N - NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 2). Peptid sa syntetizoval vo forme amidu zo zodpovedajúcich východiskových materiálov podľa všeobecného opisu syntézy. Peptid sa potom cyklizoval oxidáciou pomocou I<sub>2</sub>. Peptid sa rozpustil v kyseline octovej/metanole (1:4) a pridalo sa 0,1 M I<sub>2</sub> v metanole. Čistota sa stanovila analýzou HPLC a štruktúra sa potvrdila analýzou aminokyselín a hmotnostnou spektrometriou (LDI-MS).

Čistota (HPLC): viac než 97 % (menej ako 1 % jednotlivkej nečistoty)

Mólová hmotnosť (voľná báza): 2746,2

## PRÍKLAD 2

Príprava F V I P R L E P W N I H P G S Q P N I T A C T N -NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 3). Peptid sa syntetizoval vo forme amidu zo zodpovedajúcich východiskových materiálov podľa všeobecného opisu syntézy. Čistota sa stanovila analýzou HPLC a štruktúra sa potvrdila analýzou aminokyselín a hmotnostnou spektrometriou (LDI-MS).

Čistota (HPLC): viac než 97 % (menej ako 1 % jednotlivkej nečistoty)

Mólová hmotnosť (voľná báza): 2538,0

## PRÍKLAD 3

Príprava Y L L F L T K G L G I S G G G Y N I G Cit K K R Cit Q I L G - NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 5). Peptid sa syntetizoval vo forme amidu zo zodpovedajúcich východiskových materiálov podľa všeobecného opisu syntézy. Čistota sa stanovila analýzou HPLC a štruktúra sa potvrdila analýzou aminokyselín a hmotnostnou spektrometriou (LDI-MS).

## PRÍKLAD 4

Príprava Y L N I F L T R G L G I S G G G Y N I G Cit K K R Cit Q I C G - NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 6). Peptid sa syntetizoval vo forme amidu zo zodpovedajúcich východiskových materiálov podľa všeobecného opisu syntézy. Čistota sa stanovila analýzou HPLC a štruktúra sa potvrdila analýzou aminokyselín a hmotnostnou spektrometriou (LDI-MS).

Čistota (HPLC): viac než 97 % (menej ako 1 % jednotlivkej nečistoty)

Mólová hmotnosť (voľná báza): 3097,7

## PRÍKLAD 5

Príprava R I L S T Y L G R I S G G G W L S A E P V P L Q L P P L - NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 8). Peptid sa syntetizoval vo forme amidu zo zodpovedajúcich východiskových materiálov podľa všeobecného opisu syntézy. Čistota sa stanovila analýzou HPLC a štruktúra sa potvrdila analýzou aminokyselín a hmotnostnou spektrometriou (LDI-MS).

Čistota (HPLC): viac než 97 % (menej ako 1 % jednotlivéj nečistoty)

Mólová hmotnosť (voľná báza): 2990,6

## PRÍKLAD 6

Príprava R I L S T Y L G R I S G G G Y L S A E P V P L Q L P P L - NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 9). Peptid sa syntetizoval vo forme amidu zo zodpovedajúcich východiskových materiálov podľa všeobecného opisu syntézy. Čistota sa stanovila analýzou HPLC a štruktúra sa potvrdila analýzou aminokyselín a hmotnostnou spektrometriou (LDI-MS).

## PRÍKLAD 7

Príprava K L V G F P V K P Q V P G G G R L L Cit P N I T Y K A A - NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 11). Peptid sa syntetizoval vo forme amidu zo zodpovedajúcich východiskových materiálov podľa všeobecného opisu syntézy. Čistota sa stanovila analýzou HPLC a štruktúra sa potvrdila analýzou aminokyselín a hmotnostnou spektrometriou (LDI-MS).

## PRÍKLAD 8

Príprava R L V G F P V K P Q V P G G G R L L R P L T Y K A A - NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 12). Peptid sa syntetizoval vo forme amidu zo zodpovedajúcich východiskových materiálov podľa všeobecného opisu syntézy. Čistota sa stanovila a-

analýzou HPLC a štruktúra sa potvrdila analýzou aminokyselín a hmotnostnou spektrometriou (LDI-MS).

Čistota (HPLC): viac než 97 % (menej ako 1 % jednotlivých nečistoty)

Mólová hmotnosť (voľná báza): 2790,4

Molekulový vzorec:  $C_{130}H_{217}O_{39}N_{29}$

## PRÍKLAD 9

Dimerizácia pomocou disulfidického mostíka.

Sekvencie peptidov z príkladu 2 sa spojili oxidačným krokom za vzniku dipeptidu, v ktorom cysteínové zvyšky tvoria disulfidický mostík. Mostík sa vytvoril jedným z dvoch spôsobov:

A) Oxidácia pomocou  $I_2$ . Peptidy (rovnaké množstvá, ak sú rôzne) sa rozpustia v kyseline octovej/metanole (1:4) a pridá sa 0,1 M  $I_2$  v metanole za vzniku zmesi homodiméru,

alebo

B) Oxidácia pomocou [Cys(Spy)<sup>22</sup>]-SEQ ID NO: 3. 2,3 mM peptidu SEQ ID NO: 3 rozpusteného v 2 M AcOH (aq) a 2-propanolu (1:1) sa nechajú reagovať s 2,2-ditiodipyridínom (3 ekv), pričom sa získa [Cys(Spy)<sup>22</sup>]-SEQ ID NO: 3. [Cys(Spy)<sup>22</sup>]-SEQ ID NO: 3 sa rozpustí v 10 mM  $NH_4Oac$  (aq pH=6,5) a metanole (5:2), pričom sa získa dimér SEQ ID NO: 13.

Čistota výsledného diméru sa určuje analýzou HPLC a štruktúra sa potvrdzuje analýzou aminokyselín a hmotnostnou spektrometriou (LDI-MS).

## PRÍKLAD 10

Príprava F V I H R L E P W L H P G S Q H N I T A S T N -  $NH_2$  (SEQ ID NO: 14). Peptid sa syntetizoval vo forme amidu zo zodpovedajúcich východisko-

vých materiálov podľa všeobecného opisu syntézy. Čistota sa stanovila analýzou HPLC a štruktúra sa potvrdila analýzou aminokyselín a hmotnostnou spektrometriou (LDI-MS).

Čistota (HPLC): viac než 98 % (menej ako 1 % jednotlivých nečistoty)

Mólová hmotnosť (voľná báza): 2540,2

#### PRÍKLAD 11

Príprava R L V G F P V K P Q V P G L L R P L T Y K A A - NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 15). Peptid sa syntetizoval vo forme amidu zo zodpovedajúcich východiskových materiálov podľa všeobecného opisu syntézy. Čistota sa stanovila analýzou HPLC a štruktúra sa potvrdila analýzou aminokyselín a hmotnostnou spektrometriou (LDI-MS).

Čistota (HPLC): viac než 99 % (menej ako 1 % jednotlivých nečistoty)

Mólová hmotnosť (voľná báza): 2520,3

#### PRÍKLAD 12 - REFERENČNÝ PRÍKLAD

Príprava prirodzenej sekvencie tat1; M E S V D P R L E P W K H P G S Q P K T A C T N - NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 16). Peptid sa syntetizoval vo forme amidu zo zodpovedajúcich východiskových materiálov podľa všeobecného opisu syntézy. Čistota sa stanovila analýzou HPLC a štruktúra sa potvrdila analýzou aminokyselín a hmotnostnou spektrometriou (LDI-MS).

Čistota (HPLC): viac než 97 % (menej ako 1 % jednotlivých nečistoty)

Mólová hmotnosť (voľná báza): 2708,1

#### PRÍKLAD 13 - REFERENČNÝ PRÍKLAD

Príprava prirodzenej sekvencie tat2; Q V C F I T K G L G I S Y G R K K R R Q R R R - NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 17). Peptid sa syntetizoval vo forme amidu zo

zodpovedajúcich východiskových materiálov podľa všeobecného opisu syntézy. Čistota sa stanovila analýzou HPLC a štruktúra sa potvrdila analýzou aminokyselín a hmotnostnou spektrometriou (LDI-MS).

Čistota (HPLC): viac než 94 %

Mólová hmotnosť (voľná báza): 2806,4

#### PRÍKLAD 14 - REFERENČNÝ PRÍKLAD

Príprava prirodzenej sekvencie Nef; E E V G F P V R P Q V P L R P M T Y K A A - NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 18). Peptid sa syntetizoval vo forme amidu zo zodpovedajúcich východiskových materiálov podľa všeobecného opisu syntézy. Čistota sa stanovila analýzou HPLC a štruktúra sa potvrdila analýzou aminokyselín a hmotnostnou spektrometriou (LDI-MS).

Čistota (HPLC): viac než 95 %

Mólová hmotnosť (voľná báza): 2384,8

#### PRÍKLAD 15

Pripraví sa vakcína obsahujúca peptidy SEQ ID NO: 3 a 12. Lyofilizované peptidy sa rozpustia v sterilnej vode na výslednú koncentráciu 4 mg/ml. Pripraví sa tiež preparát faktoru stimulujúceho granulocytovo-makrofágové kolónie (GM-CSF) podľa návodu na použitie výrobcu s výslednou koncentráciou 0,3 mg/ml. Tieto dva roztoky sa podávajú intrakutánne. Typická injekčná dávka je 100 µl.

#### PRÍKLAD 16

Pripraví sa vakcína obsahujúca peptidy SEQ ID NOS: 14 a 15. Lyofilizované peptidy sa rozpustia v sterilnej vode na výslednú koncentráciu 4 mg/ml. Pripraví sa tiež preparát faktoru stimulujúceho granulocytovo-makrofágové koló-

nie (GM-CSF) podľa návodu na použitie výrobcu s výslednou koncentráciou 0,3 mg/ml. Tieto dva roztoky sa podávajú intrakutánne. Typická injekčná dávka je 100  $\mu$ l.

#### PRÍKLAD 17

Roztok alebo suspenzia antigénu sa zmieša s rovnakými množstvami Freundovho adjuvantu od Behringa, úplného alebo neúplného, a potom sa jemne emulguje natiiahnutím do injekčnej striekačky a rýznym vytlačením z nej, alebo homogénizátorom. Emulzia by mala ostať stabilná aspoň 30 minút. Emulzie anti-gén-adjuvant je najlepšie podávať injekčne subkutánne ako depot.

#### PRÍKLAD 18

Imunologická skúška na detekciu protilátok vyvolaných HIV-1

Činidlá s magnetickými časticami sa pripravujú podľa protokolu odporúčaného výrobcem. Dynal AS je výrobcom Dynabeads, ktoré sa použili. Magnetické častice pokryté ligandom sa nazývajú Činidlo 1. Peptid podľa tohto vynálezu je kovalentne naviazaný na predaktivovaný povrch magnetických častíc. Je tiež možné absorbovať peptid fyzikálne na povrchu magnetických častíc. Koncentrácia častíc v Činidle 1 je v rozsahu od 1 mg/ml do 15 mg/ml. Veľkosť častíc sa mení v rozsahu 0,2  $\mu$ m až 15  $\mu$ m. Koncentrácia peptidov je v rozsahu od 0,01 mg/mg častíc do 1 mg/mg častíc.

Antihumánnou Ig alkalickou fosfatázou (AP) konjugované protilátkové činidlo sa pripraví podľa odporúčaného protokolu Dako AS. Tento protokol je štandardným postupom v tomto odbore. Toto činidlo sa nazýva Činidlo 2.

Roztok substrátu fenolftaleínmonofosfátu sa pripraví podľa odporúčaného protokolu Fluka AG. Tento protokol je štandardným postupom v tomto odbore. Roztok substrátu sa nazýva Činidlo 3.

Použitý premývací a inkubačný tlmivý roztok je štandardný tlmivý roztok 0,05 M tris-zásady s nasledujúcimi prídavnými zlúčeninami: Tween 20 (0,01% až 0,1%), glycerol (0,1% až 10%) a chlorid sodný (0,2% až 0,1%).

Postup skúšky zahŕňa inkubačný krok, v ktorom sa v každej jamke zmieša 1 kvapka Činidla 1 s 2 kvapkami premývacieho tlmivého roztoku. Po zmiešaní sa pridá 30 µl vzorky a roztok sa inkubuje 5 minút. Magnetické častice sa môžu magnetom zachytiť a kvapalina sa môže odstrániť, po čom sa magnet oddiali. Potom sa jamky vypláchnu dvakrát 4 kvapkami premývacieho roztoku, po čom nasleduje inkubácia Činidlom 2. Pridá sa 1 kvapka Činidla 2 s 2 kvapkami premývacieho tlmivého roztoku a roztok sa inkubuje 5 minút. Magnetické častice sa môžu magnetom zachytiť a kvapalina sa môže odstrániť, po čom sa magnet oddiali. Potom sa premývací krok opakuje a nasleduje inkubácia s Činidlom 3. Do každej jamky sa pridajú 2 kvapky Činidla 3 a roztok sa inkubuje 3 minúty. Výsledky sa môžu odčítať oproti bielemu pozadiu. Pozitívne výsledky sú červené (3+ = sýto červené), kým negatívne výsledky sú jasne svetložlté/svetlohnedé roztoky, aké sa získajú pri negatívnej kontrole.

## PRÍKLAD 19

### Terapeutická a profylaktická vakcína

Aspoň jeden z peptidov podľa tohto vynálezu vybratý zo skupiny sekvenčii SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 7 alebo SEQ ID NO: 10 môže tvoriť antigény a predstavovať aktívnu zložku profylaktickej alebo terapeutickkej vakcíny určenej na to, aby poskytovala ochranu proti vírusu ľudskej imunitnej nedostatočnosti typu 1 (HIV-1). Vakcína môže obsahovať zlúčeniny, ktoré majú priaznivé účinky pri ochrane alebo stimulácii imunitného systému hostiteľa (človeka alebo iného živočícha-stavovca), napríklad interleukíny, interferóny, rastové faktory granulocytov-makrofágov, hematopoetické rastové faktory a podobne. Vakcíny ďalej výhodne obsahujú adjuvant alebo vehikulum, výhodnejšie je adjuvantom alebo vehikulom monofosforyllipid A (MPL ®), prípadne s alumom, Freundov adjuvant (úplný alebo neúplný) alebo hydroxid hli-

nitý. Optimálne množstvo adjuvantu/vehikula bude závisieť od vybratého typu (typov).

Peptidy podľa tohto vynálezu by sa mohli modifikovať C-koncovou adíciou jednoduchej mastnej kyseliny, ako je jednoduchý palmitoylový reťazec, za vzniku lipopeptidovej vakcíny. Lipopeptidy sa môžu ďalej zaviesť do lipozómových membrán metódou cyklov zmrazenia a roztopenia, čím sa získajú lipozómy, ktoré majú na svojom povrchu peptidové ligandy.

Preparát peptidu alebo vakcíny sa pred uskladnením môže lyofilizovať. Lyofilizované peptidy sa môžu rozpustiť v sterilnej vode na konečnú koncentráciu 0,1 - 100 mg/ml. Vakcína sa môže skladovať výhodne pri nízkej teplote, v ampulách obsahujúcich jednu alebo viac jednotkových dávok použiteľných bez úpravy. Typická jednotková dávka peptidu podľa tohto vynálezu je v rozmedzí koncentrácií: 0,05 µg - 1 mg na kg telesnej hmotnosti, výhodne 0,15 µg - 0,15 mg na kg telesnej hmotnosti. Osoby s praxou v problematike ocenia, že vhodná dávka bude závisieť na telesnej hmotnosti pacienta, na type ochorenia, závažnosti stavu, spôsobe podávania a niektorých ďalších faktoroch. Keď sa používa vakcína ako terapeutická, môže sa podať až dvanásťkrát, injekčne. Za tým môžu nasledovať aj ďalšie dávky injekcií a v niektorých prípadoch sa môže pokračovať počas celého života pacientov. Pri príprave injekčného roztoku sa peptidy rozpustia v sterilnej vode na výslednú koncentráciu 1 mg/ml peptidu. Typický objem injekcie je 100 µl až 200 µl (2×100 µl). Peptid sa výhodne podáva spolu s vhodným adjuvantom a/alebo s rastovým faktorom granulocytov-makrofágov, napríklad s prípravkom Leucomax® «Shering Plough» pripraveným v koncentračnom rozsahu od 0,1 mg/ml do 1 mg/ml alebo podľa návodov na použitie od ich výrobcov. Obzvlášť výhodnou je kombinovaná terapia, kde sa tieto peptidy podávajú spolu s peptidmi, ktoré sú opísané v publikovanej medzinárodnej prihláške patentu č. PCT/NO00/00075 a/alebo v spoločne predjednávanej prihláške nórskeho patentu č. 20004413. Tieto peptidy sa môžu podávať súčasne alebo po sebe. Vhodným spôsobom podania môže byť intrakutánne, subkutánne, intravenózne, perorálne, intramuskulárne, intranazálne, mukozálne alebo inou vhodnou cestou. Na udržanie ochranného účinku sa môže vyžadovať opakované podávanie. Pre odborníkov v problematike bude zrejmé,

že vakcínové kompozície podľa tohto vynálezu sú prospešné nielen v prevencii infekcie, ale aj pri liečbe infekcie.

Žiadne toxické účinky peptidov podľa tohto vynálezu sa nepozorovali, keď sa podali injekčne myšiam v dávke 100  $\mu$ g na kg telesnej hmotnosti.

Vyššie uvedené príklady sú mienené len ako ilustrácia vynálezu. Musí to byť chápané tak, že osoba s praxou v problematike môže modifikovať tu opísané peptidy, antigény a vakcíny tak, že sa neodchýlia od zmyslu a z rámca tohto vynálezu, ako je uvedené v nárokoch.

## ZOZNAM SEKVENCIÍ

## (1) VŠEOBECNÉ INFORMÁCIE:

## (i) PRIHLASOVATEĽ:

- (A) MENO: Bionor Immuno AS
- (B) ULICA: Strømdalsjordet 4, P.O.Box 1893 Gulset
- (C) MESTO: 3703 Skien

- (E) ŠTÁT: Nórsko
- (F) POŠTOVÝ KÓD (ZIP): N-3705
- (G) TELEFÓN: +47 35 50 57 50
- (H) TELEFAX: + 47 35 50 57 01

## (i) PÔVODCA:

- (A) MENO : Birger Sørensen
- (B) ULICA : Meierlia 3
- (C) MESTO : 3727 Skien
- (D) ŠTÁT: Nórsko

(ii) NÁZOV VYNÁLEZU: Regulačné a pomocné peptidy HIV, antigény, vakcínové kompozície, súprava na imunologickú skúšku a spôsob detekcie protilátok vyvolaných HIV.

## (iii) POČET SEKVENCIÍ: 18

## (iv) POČÍTAČOVÁ ČÍTACIA FORMA:

- (A) TYP MÉDIA: Floppy disk
- (B) POČÍTAČ: IBM Kompatibilný
- (C) OPERAČNÝ SYSTÉM: Windows 2000
- (D) SOFTWARE: Word 7.0

(v) ÚDAJE O SÚČASNEJ PRIHLÁŠKE:  
ČÍSLO PRIHLÁŠKY:

## (2) INFORMÁCIE O SEQ ID NO:1:

## (i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCIE:

- (A) DĹŽKA: 22-24 aminokyselín
- (B) TYP: aminokyselina
- (C) REŤAZEC: jednoduchý
- (D) TOPOLOGIA: obidvoje

## (ii) TYP MOLEKULY: peptid

## (iii) HYPOTETICKÁ: Nie

## (v) TYP FRAGMENTU : vnútorný

## (ix) ZNAKY:

- (A) MENO/KĹÚČ: Modifikované miesto
- (B) UMIESTNENIE: 1
- (D) ĎALŠIE INFORMÁCIE: /poznámka = " Xaa v polohe 1 je Met, Ser, Cys alebo nič

ix) ZNAKY:

(A) MENO/KL'ÚČ: Modifikované miesto

(B) UMIESTNENIE: 2

(D) ĎALŠIE INFORMÁCIE: /poznámka = " Xaa v polohe 2 je Glu, Asp, Val, Ser alebo nič

ix) ZNAKY:

(A) MENO/KL'ÚČ: Modifikované miesto

(B) UMIESTNENIE: 3

(D) ĎALŠIE INFORMÁCIE: /poznámka = " Xaa v polohe 3 je Ser, Gln, Pro, Leu, Val, Ala, Trp, Tyr alebo Phe

ix) ZNAKY:

(A) MENO/KL'ÚČ: Modifikované miesto

(B) UMIESTNENIE: 4

(D) ĎALŠIE INFORMÁCIE: /poznámka = " Xaa v polohe 4 je Val alebo Ile

ix) ZNAKY:

(A) MENO/KL'ÚČ: Modifikované miesto

(B) UMIESTNENIE: 5

(D) ĎALŠIE INFORMÁCIE: /poznámka = " Xaa v polohe 5 je Asp, Asn alebo Ile

ix) ZNAKY:

(A) MENO/KL'ÚČ: Modifikované miesto

(B) UMIESTNENIE: 6

(D) ĎALŠIE INFORMÁCIE: /poznámka = " Xaa v polohe 6 je Pro, His alebo Ala

ix) ZNAKY:

(A) MENO/KL'ÚČ: Modifikované miesto

(B) UMIESTNENIE: 7

(D) ĎALŠIE INFORMÁCIE: /poznámka = " Xaa v polohe 7 je Arg, Asn, Ser, Lys, Glu alebo Asp

ix) ZNAKY:

(A) MENO/KL'ÚČ: Modifikované miesto

(B) UMIESTNENIE: 12

(D) ĎALŠIE INFORMÁCIE: /poznámka = " Xaa v polohe 12 je Leu, Ile alebo Nle

ix) ZNAKY:

(A) MENO/KL'ÚČ: Modifikované miesto

(B) UMIESTNENIE: 15

(D) ĎALŠIE INFORMÁCIE: /poznámka = " Xaa v polohe 15 je Gly alebo Pro

ix) ZNAKY:

(A) MENO/KL'ÚČ: Modifikované miesto

(B) UMIESTNENIE: 16

(D) ĎALŠIE INFORMÁCIE: /poznámka = " Xaa v polohe 16 je Ser, Asn alebo Ala

ix) ZNAKY:

(A) MENO/KL'ÚČ: Modifikované miesto

(B) UMIESTNENIE: 17

(D) ĎALŠIE INFORMÁCIE: /poznámka = " Xaa v polohe 17 je Gln, Lys alebo Thr

ix) ZNAKY:

(A) MENO/KL'ÚČ: Modifikované miesto

- (B) UMIESTNENIE: 18  
 (D) ĎALŠIE INFORMÁCIE: /poznámka = " Xaa v polohe 18 je Pro alebo His

ix) ZNAKY:

- (A) MENO/KLÚČ: Modifikované miesto  
 (B) UMIESTNENIE: 19  
 (D) ĎALŠIE INFORMÁCIE: /poznámka = " Xaa v polohe 19 je Lys, Thr, Ser, Ala, Arg, Pro, Glu, Leu, Ile alebo Nle

ix) ZNAKY:

- (A) MENO/KLÚČ: Modifikované miesto  
 (B) UMIESTNENIE: 20  
 (D) ĎALŠIE INFORMÁCIE: /poznámka = " Xaa v polohe 20 je Thr, Ala, alebo Ile

ix) ZNAKY:

- (A) MENO/KLÚČ: Modifikované miesto  
 (B) UMIESTNENIE: 21  
 (D) ĎALŠIE INFORMÁCIE: /poznámka = " Xaa v polohe 21 je Ala, Pro, Asp alebo Val

ix) ZNAKY:

- (A) MENO/KLÚČ: Modifikované miesto  
 (B) UMIESTNENIE: 22  
 (D) ĎALŠIE INFORMÁCIE: /poznámka = " Xaa v polohe 22 je Cys alebo Ser

ix) ZNAKY:

- (A) MENO/KLÚČ: Modifikované miesto  
 (B) UMIESTNENIE: 23  
 (D) ĎALŠIE INFORMÁCIE: /poznámka = " Xaa v polohe 23 je Thr, Asn alebo Ser

ix) ZNAKY:

- (A) MENO/KLÚČ: Modifikované miesto  
 (B) UMIESTNENIE: 24  
 (D) ĎALŠIE INFORMÁCIE: /poznámka = " Xaa v polohe 24 je Asn, Lys, Arg, Gln, Ala, Pro alebo Thr

ix) ZNAKY:

- (A) MENO/KLÚČ: Modifikované miesto  
 (B) UMIESTNENIE: 1  
 (D) ĎALŠIE INFORMÁCIE: /poznámka = " Cys v polohe 1 môže tvoriť časť disulfidického mostíka

ix) ZNAKY:

- (A) MENO/KLÚČ: Modifikované miesto  
 (B) UMIESTNENIE: 22  
 (D) ĎALŠIE INFORMÁCIE: /poznámka = " Cys v polohe 22 môže tvoriť časť disulfidického mostíka

(xi) OPIS SEKVENCIE: SEQ ID NO: 1 :

Xaa<sub>1</sub> Xaa<sub>2</sub> Xaa<sub>3</sub> Xaa<sub>4</sub> Xaa<sub>5</sub> Xaa<sub>6</sub> Xaa<sub>7</sub> Leu Glu Pro Trp Xaa<sub>12</sub> His Pro Xaa<sub>15</sub> Xaa<sub>16</sub> Xaa<sub>17</sub>  
 1 5 10 15

Xaa<sub>18</sub> Xaa<sub>19</sub> Xaa<sub>20</sub> Xaa<sub>21</sub> Xaa<sub>22</sub> Xaa<sub>23</sub> Xaa<sub>24</sub>  
 20

## (2) INFORMÁCIE O SEQ ID NO:2:

## (i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCIE:

- (A) DĹŽKA: 24 aminokyselín
- (B) TYP: aminokyselina
- (C) REŤAZEC: jednoduchý
- (D) TOPOLOGIA: obidvoje

(ii) TYP MOLEKULY: peptid

(iii) HYPOTETICKÁ: Nie

## ix) ZNAKY:

- (A) MENO/KLÚČ: Modifikované miesto
- (B) UMIESTNENIE: 1...22
- (D) ĎALŠIE INFORMÁCIE: /poznámka = " Cys v polohe 1 a 22 môže tvoriť časť vnútroreťazcového disulfidického mostíka

## (xi) OPIS SEKVENCIE: SEQ ID NO: 2 :

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

Ala Cys Thr Asn

## (2) INFORMÁCIE O SEQ ID NO: 3 :

## (i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCIE:

- (A) DĹŽKA: 22 aminokyselín
- (B) TYP: aminokyselina
- (C) REŤAZEC: jednoduchý
- (D) TOPOLOGIA: obidvoje

(ii) TYP MOLEKULY: peptid

(iii) HYPOTETICKÁ: Nie

## (xi) OPIS SEKVENCIE: SEQ ID NO: 3 :

Phe Val Ile Pro Arg Leu Glu Pro Trp Ile His Pro Gly Ser Gln Pro Ile Thr Ala Cys  
1                    5                    10                    15                    20

Thr Asn

## (2) INFORMÁCIE O SEQ ID NO: 4 :

## (i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCIE:

- (A) DĹŽKA: 24-27 aminokyselín
- (B) TYP: aminokyselina
- (C) REŤAZEC: jednoduchý
- (D) TOPOLOGIA: obidvoje

(ii) TYP MOLEKULY: peptid

(iii) HYPOTETICKÁ: Nie

ix) ZNAKY:

(A) MENO/KLÚČ: Modifikované miesto

(B) UMIESTNENIE: 1

(D) ĎALŠIE INFORMÁCIE: /poznámka = " Xaa v polohe 1 je Pro, Ile, Leu, Thr, Tyr alebo Val

ix) ZNAKY:

(A) MENO/KLÚČ: Modifikované miesto

(B) UMIESTNENIE: 2

(D) ĎALŠIE INFORMÁCIE: /poznámka = " Xaa v polohe 2 je Val, Ala Cys, Leu,

ix) ZNAKY:

(A) MENO/KLÚČ: Modifikované miesto

(B) UMIESTNENIE: 3

(D) ĎALŠIE INFORMÁCIE: /poznámka = " Xaa v polohe 3 je Cys, Ile, Leu, Val alebo Nie

ix) ZNAKY:

(A) MENO/KLÚČ: Modifikované miesto

(B) UMIESTNENIE: 5

(D) ĎALŠIE INFORMÁCIE: /poznámka = " Xaa v polohe 5 je Ile, Leu, Gln, Met alebo Thr

ix) ZNAKY:

(A) MENO/KLÚČ: Modifikované miesto

(B) UMIESTNENIE: 6

(D) ĎALŠIE INFORMÁCIE: /poznámka = " Xaa v polohe 6 je Thr, Asn, Lys alebo Arg

ix) ZNAKY:

(A) MENO/KLÚČ: Modifikované miesto

(B) UMIESTNENIE: 7

(D) ĎALŠIE INFORMÁCIE: /poznámka = " Xaa v polohe 7 je Lys, Arg alebo Gln

ix) ZNAKY:

(A) MENO/KLÚČ: Modifikované miesto

(B) UMIESTNENIE: 8

(D) ĎALŠIE INFORMÁCIE: /poznámka = " Xaa v polohe 8 je Gly alebo Ala

ix) ZNAKY:

(A) MENO/KLÚČ: Modifikované miesto

(B) UMIESTNENIE: 9

(D) ĎALŠIE INFORMÁCIE: /poznámka = " Xaa v polohe 9 je Leu alebo Ile

ix) ZNAKY:

(A) MENO/KLÚČ: Modifikované miesto

(B) UMIESTNENIE: 10

(D) ĎALŠIE INFORMÁCIE: /poznámka = " Xaa v polohe 10 je Gly, Ser alebo Ala

ix) ZNAKY:

- (A) MENO/KLÚČ: Modifikované miesto
- (B) UMIESTNENIE: 11
- (D) ĎALŠIE INFORMÁCIE: /poznámka = " Xaa v polohe 11 je Ile alebo Gly

ix) ZNAKY:

- (A) MENO/KLÚČ: Modifikované miesto
- (B) UMIESTNENIE: 12
- (D) ĎALŠIE INFORMÁCIE: /poznámka = " Xaa v polohe 12 je Ser, Phe alebo Tyr

ix) ZNAKY:

- (A) MENO/KLÚČ: Modifikované miesto
- (B) UMIESTNENIE: Xaa, vložený pred polohou 14
- (D) ĎALŠIE INFORMÁCIE: /poznámka = " Xaa, vložený pred polohou 14 je Leu, Ile,

Nle

ix) ZNAKY:

- (A) MENO/KLÚČ: Modifikované miesto
- (B) UMIESTNENIE: 15
- (D) ĎALŠIE INFORMÁCIE: /poznámka = " Xaa v polohe 15 je Arg, Lys, Ser alebo

Citrulín

ix) ZNAKY:

- (A) MENO/KLÚČ: Modifikované miesto
- (B) UMIESTNENIE: 19
- (D) ĎALŠIE INFORMÁCIE: /poznámka = " Xaa v polohe 19 je Arg, Lys, Ser, Gly alebo

Citrulín

ix) ZNAKY:

- (A) MENO/KLÚČ: Modifikované miesto
- (B) UMIESTNENIE: 20
- (D) ĎALŠIE INFORMÁCIE: /poznámka = " Xaa v polohe 20 je Gln, Arg alebo Pro

ix) ZNAKY:

- (A) MENO/KLÚČ: Modifikované miesto
- (B) UMIESTNENIE: 21
- (D) ĎALŠIE INFORMÁCIE: /poznámka = " Xaa v polohe 21 je Ile alebo leu

ix) ZNAKY:

- (A) MENO/KLÚČ: Modifikované miesto
- (B) UMIESTNENIE: 22
- (D) ĎALŠIE INFORMÁCIE: /poznámka = " Xaa v polohe 22 je Gly, Leu, Ile, Cys alebo

nič

ix) ZNAKY:

- (A) MENO/KLÚČ: Modifikované miesto
- (B) UMIESTNENIE: 23
- (D) ĎALŠIE INFORMÁCIE: /poznámka = " Xaa v polohe 23 je Gly alebo nič

ix) ZNAKY:

- (A) MENO/KLÚČ: Modifikované miesto
- (B) UMIESTNENIE: 12..13
- (D) ĎALŠIE INFORMÁCIE: /poznámka = " prípadne vložený spoj –Z-

ix) ZNAKY:

- (A) MENO/KLÚČ: Modifikované miesto  
(B) UMIESTNENIE: 2, 3 a 22  
(D) ĎALŠIE INFORMÁCIE: /poznámka = " Cys v polohách 2, 3 a 22 môže tvoriť časť disulfidického mostíka

(xi) OPIS SEKVENCIE: SEQ ID NO: 4 :

Xaa<sub>1</sub> Xaa<sub>2</sub> Xaa<sub>3</sub> Phe Xaa<sub>5</sub> Xaa<sub>6</sub> Xaa<sub>7</sub> Xaa<sub>8</sub> Xaa<sub>9</sub> Xaa<sub>10</sub> Xaa<sub>11</sub> Xaa<sub>12</sub> -Z- Tyr Xaa<sub>1</sub> Gly  
1 5 10 15

Xaa<sub>15</sub> Lys Lys Arg Xaa<sub>19</sub> Xaa<sub>20</sub> Xaa<sub>21</sub> Xaa<sub>22</sub> Xaa<sub>23</sub>  
20

(2) INFORMÁCIE O SEQ ID NO: 5 :

(i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCIE:

- (A) DĹŽKA: 27 aminokyselín  
(B) TYP: aminokyselina  
(C) REŤAZEC: jednoduchý  
(D) TOPOLOGIA: obidvoje

(ii) TYP MOLEKULY: peptid

(iii) HYPOTETICKÁ: Nie

ix) ZNAKY:

- (A) MENO/KLÚČ: Modifikované miesto  
(B) UMIESTNENIE: 12..13  
(D) ĎALŠIE INFORMÁCIE: /poznámka = " vložený Gly-mostík 3 zvyškov

(xi) OPIS SEKVENCIE: SEQ ID NO: 5 :

Tyr Leu Leu Phe Leu Thr Lys Gly Leu Gly Ile Ser Gly Gly Gly Tyr Nle Gly Cit Lys Lys  
1 5 10 15 20

Arg Cit Gln Ile Leu Gly  
25

(2) INFORMÁCIE O SEQ ID NO: 6 :

(i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCIE:

- (A) DĹŽKA: 28 aminokyselín  
(B) TYP: aminokyselina  
(C) REŤAZEC: jednoduchý  
(D) TOPOLOGIA: obidvoje

(ii) TYP MOLEKULY: peptid

(iii) HYPOTETICKÁ: Nie

ix) ZNAKY:

- (A) MENO/KLÚČ: Modifikované miesto  
(B) UMIESTNENIE: 12..13  
(D) ĎALŠIE INFORMÁCIE: /poznámka = " vložený Gly-mostík 3 zvyškov



ix) ZNAKY:

(A) MENO/KL'ÚČ: Modifikované miesto

(B) UMIESTNENIE: 11

(D) ĎALŠIE INFORMÁCIE: /poznámka = " Xaa v polohe 11 je Ala, Thr, Glu, Gln, Val, Pro alebo Ser

ix) ZNAKY:

(A) MENO/KL'ÚČ: Modifikované miesto

(B) UMIESTNENIE: 12

(D) ĎALŠIE INFORMÁCIE: /poznámka = " Xaa v polohe 12 je Glu, Lys, Gln, Asp, Asn, Tyr, Trp alebo Phe

ix) ZNAKY:

(A) MENO/KL'ÚČ: Modifikované miesto

(B) UMIESTNENIE: Xaa<sub>i</sub> vložený za polohou 13

(D) ĎALŠIE INFORMÁCIE: /poznámka = " Xaa<sub>i</sub> vložený za polohou 13 je Ser, Pro, Phe, Leu alebo Ile

ix) ZNAKY:

(A) MENO/KL'ÚČ: Modifikované miesto

(B) UMIESTNENIE: Xaa, vložený pred polohou 14

(D) ĎALŠIE INFORMÁCIE: /poznámka = " Xaa, vložený pred polohou 14 je Ala, Thr, Glu, Gln, Val, Pro, alebo Ser

ix) ZNAKY:

(A) MENO/KL'ÚČ: Modifikované miesto

(B) UMIESTNENIE: 14

(D) ĎALŠIE INFORMÁCIE: /poznámka = " Xaa v polohe 14 je Glu, Lys, Gln, Asp alebo Asn

ix) ZNAKY:

(A) MENO/KL'ÚČ: Modifikované miesto

(B) UMIESTNENIE: 15

(D) ĎALŠIE INFORMÁCIE: /poznámka = " Xaa v polohe 15 je Pro, Ser, Ala alebo Asn

ix) ZNAKY:

(A) MENO/KL'ÚČ: Modifikované miesto

(B) UMIESTNENIE: 16

(D) ĎALŠIE INFORMÁCIE: /poznámka = " Xaa v polohe 16 je Val, Asn, Gly alebo Pro

ix) ZNAKY:

(A) MENO/KL'ÚČ: Modifikované miesto

(B) UMIESTNENIE: 17

(D) ĎALŠIE INFORMÁCIE: /poznámka = " Xaa v polohe 17 je Pro, Gln, His, Ser, Leu, Arg, Thr, Asp alebo Ile

ix) ZNAKY:

(A) MENO/KL'ÚČ: Modifikované miesto

(B) UMIESTNENIE: 18

(D) ĎALŠIE INFORMÁCIE: /poznámka = " Xaa v polohe 18 je Leu Phe alebo Val

ix) ZNAKY:



- (B) TYP: aminokyselina
- (C) REŤAZEC: jednoduchý
- (D) TOPOLOGIA: obidvoje

(ii) TYP MOLEKULY: peptid

(iii) HYPOTETICKÁ: Nie

ix) ZNAKY:

- (A) MENO/KLÚČ: Modifikované miesto
- (B) UMIESTNENIE: 11..12
- (D) ĎALŠIE INFORMÁCIE: /poznámka = " vložený [Gly]<sub>n</sub> mostík, kde n = 3

(xi) OPIS SEKVENCIE: SEQ ID NO: 9 :

Arg Ile Leu Ser Thr Tyr Leu Gly Arg Ile Ser Gly Gly Gly Tyr Leu Ser Ala Glu Pro Val  
1                    5                    10                    15                    20  
Pro Leu Gln Leu Pro Pro Leu  
25

(2) INFORMÁCIE O SEQ ID NO: 10 :

(i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCIE:

- (A) DĹŽKA: 22-29 aminokyselín
- (B) TYP: aminokyselina
- (C) REŤAZEC: jednoduchý
- (D) TOPOLOGIA: obidvoje

(ii) TYP MOLEKULY: peptid

(iii) HYPOTETICKÁ: Nie

ix) ZNAKY:

- (A) MENO/KLÚČ: Modifikované miesto
- (B) UMIESTNENIE: 1
- (D) ĎALŠIE INFORMÁCIE: /poznámka = " Xaa v polohe 1 je Lys alebo Arg

ix) ZNAKY:

- (A) MENO/KLÚČ: Modifikované miesto
- (B) UMIESTNENIE: 5
- (D) ĎALŠIE INFORMÁCIE: /poznámka = " Xaa v polohe 5 je Phe alebo Leu

ix) ZNAKY:

- (A) MENO/KLÚČ: Modifikované miesto
- (B) UMIESTNENIE: 7
- (D) ĎALŠIE INFORMÁCIE: /poznámka = " Xaa v polohe 7 je Ile alebo Val

ix) ZNAKY:

- (A) MENO/KLÚČ: Modifikované miesto
- (B) UMIESTNENIE: 8

(D) ĎALŠIE INFORMÁCIE: /poznámka = " Xaa v polohe 8 je Thr, Arg, Lys, Ala alebo Met

ix) ZNAKY:

(A) MENO/KL'ÚČ: Modifikované miesto

(B) UMIESTNENIE: 10

(D) ĎALŠIE INFORMÁCIE: /poznámka = " Xaa v polohe 10 je Gln alebo His

ix) ZNAKY:

(A) MENO/KL'ÚČ: Modifikované miesto

(B) UMIESTNENIE: 11

(D) ĎALŠIE INFORMÁCIE: /poznámka = " Xaa v polohe 11 je Val, Leu alebo Ile

ix) ZNAKY:

(A) MENO/KL'ÚČ: Modifikované miesto

(B) UMIESTNENIE: Xaa<sub>1</sub> vložený pred polohou 13

(D) ĎALŠIE INFORMÁCIE: /poznámka = " Leu je vložený pred polohou 13

ix) ZNAKY:

(A) MENO/KL'ÚČ: Modifikované miesto

(B) UMIESTNENIE: 13

(D) ĎALŠIE INFORMÁCIE: /poznámka = " Xaa v polohe 13 je Leu, Val alebo Thr

ix) ZNAKY:

(A) MENO/KL'ÚČ: Modifikované miesto

(B) UMIESTNENIE: 14

(D) ĎALŠIE INFORMÁCIE: /poznámka = " Xaa v polohe 14 je Arg alebo Cit

ix) ZNAKY:

(A) MENO/KL'ÚČ: Modifikované miesto

(B) UMIESTNENIE: 16

(D) ĎALŠIE INFORMÁCIE: /poznámka = " Xaa v polohe 16 je Met, Val, Ile, Leu alebo

Nle

ix) ZNAKY:

(A) MENO/KL'ÚČ: Modifikované miesto

(B) UMIESTNENIE: 17

(D) ĎALŠIE INFORMÁCIE: /poznámka = " Xaa v polohe 17 je Thr alebo Asp

ix) ZNAKY:

(A) MENO/KL'ÚČ: Modifikované miesto

(B) UMIESTNENIE: 18

(D) ĎALŠIE INFORMÁCIE: /poznámka = " Xaa v polohe 18 je Tyr, Phe alebo Arg

ix) ZNAKY:

(A) MENO/KL'ÚČ: Modifikované miesto

(B) UMIESTNENIE: 19

(D) ĎALŠIE INFORMÁCIE: /poznámka = " Xaa v polohe 19 je Lys alebo Arg





(iii) HYPOTETICKÁ: Nie

(xi) OPIS SEKVENCIE: SEQ ID NO: 14 :

Phe Val Ile His Arg Leu Glu Pro Trp Leu His Pro Gly Ser Gln His Nle Thr Ala Ser Thr Asn  
1 5 10 15 20

(2) INFORMÁCIE O SEQ ID NO: 15 :

(i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCIE:

(A) DĹŽKA: 23 aminokyselín

(B) TYP: aminokyselina

(C) REŤAZEC: dvojitý

(D) TOPOLOGIA: obidvoje

(ii) TYP MOLEKULY: peptid

(iii) HYPOTETICKÁ: Nie

(xi) OPIS SEKVENCIE: SEQ ID NO: 15 :

Arg Leu Val Gly Phe Pro Val Lys Pro Gln Val Pro Gly Leu Leu Arg Pro Leu Thr Tyr Lys Ala  
1 5 10 15 20  
Ala

(2) INFORMÁCIE O SEQ ID NO: 16 :

(i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCIE:

(A) DĹŽKA: 24 aminokyselín

(B) TYP: aminokyselina

(C) REŤAZEC: dvojitý

(D) TOPOLOGIA: obidvoje

(ii) TYP MOLEKULY: peptid

(iii) HYPOTETICKÁ: Nie, tat1 prirodzená sekvencia

(xi) OPIS SEKVENCIE: SEQ ID NO: 16 :

Met Glu Ser Val Asp Pro Arg Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser Gln Pro Lys Thr Ala Cys  
1 5 10 15 20

Thr Asn

(2) INFORMÁCIE O SEQ ID NO: 17 :

(i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCIE:

(A) DĹŽKA: 23 aminokyselín

(B) TYP: aminokyselina

(C) REŤAZEC: dvojitý

(D) TOPOLOGIA: obidvoje

45  
16

(ii) TYP MOLEKULY: peptid

(iii) HYPOTETICKÁ: Nie, tat2 prirodzená sekvencia

(xi) OPIS SEKVENCIE: SEQ ID NO: 17 :

Gln Val Cys Phe Ile Thr Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg  
1                    5                    10                    15                    20

(2) INFORMÁCIE O SEQ ID NO: 18 :

(i) CHARAKTERISTIKY SEKVENCIE:

(A) DĹŽKA: 21 aminokyselín

(B) TYP: aminokyselina

(C) REŤAZEC: dvojitý

(D) TOPOLOGIA: obidvoje

(ii) TYP MOLEKULY: peptid

(iii) HYPOTETICKÁ: Nie, prirodzená Nef sekvencia

(xi) OPIS SEKVENCIE: SEQ ID NO: 18 :

Glu Glu Val Gly Phe Pro Val Arg Pro Gln Val Pro Leu Arg Pro Met Thr Tyr Lys Ala Ala  
1                    5                    10                    21

## PATENTOVÉ NÁROKY

1. Peptid odvodený od regulačného a pomocného proteínu HIV-1 **vyznačujúci sa tým**, že zahŕňa aspoň jednu sekvenciu aminokyselín, ktorá v porovnaní s prirodzenou sekvenciou obsahuje modifikácie a je vybratá z nasledujúcich skupín sekvencií aminokyselín:

Xaa<sub>1</sub> Xaa<sub>2</sub> Xaa<sub>3</sub> Xaa<sub>4</sub> Xaa<sub>5</sub> Xaa<sub>6</sub> Xaa<sub>7</sub> Leu Glu Pro Trp Xaa<sub>12</sub> His Pro Xaa<sub>15</sub> Xaa<sub>16</sub> Xaa<sub>17</sub> Xaa<sub>18</sub> Xaa<sub>19</sub> Xaa<sub>20</sub> Xaa<sub>21</sub> Xaa<sub>22</sub> Xaa<sub>23</sub> Xaa<sub>24</sub> (SEQ ID NO: 1),

kde aminokyseliny reťazca majú nasledujúci význam;

Xaa v polohe 1 derivátu peptidu je Met, Ser, Cys alebo nič,

Xaa v polohe 2 je Glu, Asp, Val, Ser alebo nič,

Xaa v polohe 3 je Trp, Tyr alebo Phe,

Xaa v polohe 4 je Val alebo Ile,

Xaa v polohe 5 je Ile,

Xaa v polohe 6 je Pro, His alebo Ala,

Xaa v polohe 7 je Arg, Asn, Ser, Lys, Glu alebo Asp,

Xaa v polohe 12 je Leu, Ile alebo Nle,

Xaa v polohe 15 je Gly alebo Pro,

Xaa v polohe 16 je Ser, Asn alebo Ala,

Xaa v polohe 17 je Gln, Lys alebo Thr,

Xaa v polohe 18 je Pro alebo His,

Xaa v polohe 19 je Leu, Ile alebo Nle,

47  
38

Xaa v polohe 20 je Thr, Ala alebo Ile,

Xaa v polohe 21 je Ala, Pro, Asp alebo Val,

Xaa v polohe 22 je Cys alebo Ser,

Xaa v polohe 23 je Thr, Asn alebo Ser,

Xaa v polohe 24 je Asn, Lys, Arg, Gln, Ala, Pro alebo Thr,

peptid obsahuje aspoň šesť po sebe idúcich aminokyselín sekvencie  
SEQ ID NO: 1,

Xaa<sub>1</sub> Xaa<sub>2</sub> Xaa<sub>3</sub> Phe Xaa<sub>5</sub> Xaa<sub>6</sub> Xaa<sub>7</sub> Xaa<sub>8</sub> Xaa<sub>9</sub> Xaa<sub>10</sub> Xaa<sub>11</sub> Xaa<sub>12</sub> -Z- Tyr  
Xaa<sub>i</sub> Gly Xaa<sub>15</sub> Lys Lys Arg Xaa<sub>19</sub> Xaa<sub>20</sub> Xaa<sub>21</sub> Xaa<sub>22</sub> Xaa<sub>23</sub> (SEQ ID NO:  
4),

kde aminokyseliny reťazca majú nasledujúci význam;

Xaa v polohe 1 je Pro, Ile, Leu, Thr, Tyr alebo Val,

Xaa v polohe 2 je Val, Ala, Cys, Leu,

Xaa v polohe 3 je Cys, Ile, Leu, Val alebo Nle,

Xaa v polohe 5 je Ile, Leu, Gln, Met alebo Thr,

Xaa v polohe 6 je Thr, Asn, Lys alebo Arg,

Xaa v polohe 7 je Lys, Arg alebo Gln,

Xaa v polohe 8 je Gly alebo Ala,

Xaa v polohe 9 je Leu alebo Ile,

Xaa v polohe 10 je Gly, Ser alebo Ala,

Xaa v polohe 11 je Ile alebo Gly,

Xaa v polohe 12 je Ser, Phe alebo Tyr,

Xaa<sub>i</sub> vložená pred polohou 14 je Leu, Ile, Nle,

Xaa v polohe 15 je Arg, Lys, Ser alebo citrulín (Cit),

Xaa v polohe 19 je Arg, Lys, Ser, Gly alebo Cit,

Xaa v polohe 20 je Gln, Arg alebo Pro,

Xaa v polohe 21 je Ile alebo Leu,

Xaa v polohe 22 je Gly, Leu, Ile, Cys alebo nič,

Xaa v polohe 23 je Gly alebo nič,

kde sekvencia SEQ ID NO: 4 obsahuje aspoň šesť po sebe idúcich aminokyselín, -Z- je možný spoj a predstavuje PEG, modifikovaný PEG a/alebo [Gly]<sub>n</sub>, v ktorom n = 1, 2 alebo 3,

Xaa<sub>1</sub> Ile Leu Xaa<sub>4</sub> Xaa<sub>5</sub> Xaa<sub>6</sub> Leu Gly Arg Xaa<sub>10</sub> Xaa<sub>11</sub> -Z- Xaa<sub>12</sub> Leu<sub>13</sub> Xaa<sub>i</sub> Xaa<sub>i</sub> Xaa<sub>14</sub> Xaa<sub>15</sub> Xaa<sub>16</sub> Xaa<sub>17</sub> Xaa<sub>18</sub> Xaa<sub>19</sub> Leu Pro Pro Leu (SEQ ID NO: 7),

kde Xaa v polohe 1 je Phe, Tyr, Trp alebo Arg,

Xaa v polohe 4 je Gly, Ser, Asn, Asp, Cys, Val, Thr, Ala alebo Arg,

Xaa v polohe 5 je Thr, Ala, Asp, Asn alebo Ser,

Xaa v polohe 6 je Tyr, Cys, Phe, Arg, His, Ser, Val alebo Leu,

Xaa v polohe 10 je Ser, Pro, Phe, Leu alebo Ile,

Xaa v polohe 11 je Ala, Thr, Glu, Gln, Val, Pro alebo Ser,

Xaa v polohe 12 je Glu, Lys, Gln, Asp, Asn, Tyr, Trp alebo Phe,

Xaa<sub>i</sub> vložená za polohou 13 je Ser, Pro, Phe, Leu alebo Ile,

Xaa<sub>i</sub> vložená pred polohou 14 je Ala, Thr, Glu, Gln, Val, Pro alebo Ser,

Xaa v polohe 14 je Glu, Lys, Gln, Asp alebo Asn,

Xaa v polohe 15 je Pro, Ser, Ala alebo Asn,

Xaa v polohe 16 je Val, Asn, Gly alebo Pro,

Xaa v polohe 17 je Pro, Gln, His, Ser, Leu, Arg, Thr, Asp alebo Ile,

Xaa v polohe 18 je Leu, Phe alebo Val,

Xaa v polohe 19 je Gln, Leu, Pro, His, Asp alebo Glu,

kde sekvencia SEQ ID NO: 7 obsahuje aspoň šesť po sebe idúcich aminokyselín, spojka -Z- je dobrovoľná a predstavuje PEG, modifikovaný PEG a/alebo [Gly]<sub>n</sub>, v ktorom n = 1, 2 alebo 3,

Xaa<sub>1</sub> Leu Val Gly Xaa<sub>5</sub> Pro Xaa<sub>7</sub> Xaa<sub>8</sub> Pro Xaa<sub>10</sub> Xaa<sub>11</sub> Pro -Z- [Arg]<sub>m</sub>  
Xaa<sub>i</sub> Xaa<sub>13</sub> Xaa<sub>14</sub> Pro Xaa<sub>16</sub> Xaa<sub>17</sub> Xaa<sub>18</sub> Xaa<sub>19</sub> Xaa<sub>20</sub> Xaa<sub>21</sub> (SEQ ID NO:  
10),

kde Xaa v polohe 1 je Lys alebo Arg,

Xaa v polohe 5 je Phe alebo Leu,

Xaa v polohe 7 je Ile alebo Val,

Xaa v polohe 8 je Thr, Arg, Lys, Ala alebo Met,

Xaa v polohe 10 je Gln alebo His,

Xaa v polohe 11 je Val, Leu alebo Ile,

Xaa<sub>i</sub> vložená pred polohou 13 je Leu,

Xaa v polohe 13 je Leu, Val alebo Thr,

Xaa v polohe 14 je Arg alebo citrulín (Cit),

Xaa v polohe 16 je Met, Val, Ile alebo Nle, Leu,

Xaa v polohe 17 je Thr alebo Asp,

Xaa v polohe 18 je Tyr, Phe alebo Arg,

Xaa v polohe 19 je Lys alebo Arg,

Xaa v polohe 20 je Ala, Gly, Ser, Glu alebo Gln,

Xaa v polohe 21 je Ala, Ser alebo Val,

kde sekvencia SEQ ID NO: 10 obsahuje aspoň šesť po sebe idúcich aminokyselín, spojka -Z- je dobrovoľná a predstavuje PEG, modifikovaný PEG a/alebo  $[\text{Gly}]_n$ , v ktorom  $n = 1, 2$  alebo  $3$  a nezávisle od  $n$  je  $m$  v  $[\text{Arg}]_m$  rovné  $0, 1, 2$  alebo  $3$ ,

terminálnymi ukončeniami sekvencií môžu byť voľné karboxylové skupiny alebo aminoskupiny, amidy, acyly, acetyly alebo ich soli,

dva alebo viac Cys zvyškov môže tvoriť časť vnútroreťazcovej alebo medzireťazcovej disulfidickej väzby, mostík  $-\text{S}-(\text{CH}_2)_p-\text{S}-$  alebo  $-(\text{CH}_2)_p-$ , v ktorom  $p = 1$  až  $8$ , prípadne s vloženým jedným alebo viacerými heteroatómami, ako je O, N alebo S, a/alebo sú uvedené sekvencie peptidov imobilizované na tuhom nosiči.

2. Peptid podľa nároku 1, **vyznačujúci sa tým**, že sekvencia aminokyselín SEQ ID NO: 1 je vybratá zo skupín SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 a SEQ ID NO: 14.
  
3. Peptid podľa nároku 1, **vyznačujúci sa tým**, že sekvencia aminokyselín SEQ ID NO: 4 je vybratá zo skupín SEQ ID NO: 5 a SEQ ID NO: 6.

4. Peptid podľa nároku 1, **vyznačujúci sa tým**, že sekvencia aminokyselín SEQ ID NO: 7 je vybratá zo skupín SEQ ID NO: 8 a SEQ ID NO: 9.
5. Peptid podľa nároku 1, **vyznačujúci sa tým**, že sekvencia aminokyselín SEQ ID NO: 10 je vybratá zo skupín SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 a SEQ ID NO: 15.
6. Antigen **vyznačujúci sa tým**, že zahŕňa aspoň jeden peptid podľa nároku 1.
7. Antigen podľa nároku 6, **vyznačujúci sa tým**, že zahŕňa aspoň jeden peptid vybraný aspoň z jednej zo skupín SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 7 a SEQ ID NO: 10.
8. Vakcínová kompozícia, **vyznačujúca sa tým**, že zahŕňa antigén podľa nároku 6 s farmaceuticky prijateľným riedidlom a prípadne s adjuvantom, nosičom a/alebo vehikulom a prípadne s prídavnou imunostimulačnou látkou (látkami).
9. Vakcínová kompozícia podľa nároku 8, **vyznačujúca sa tým**, že zahŕňa aspoň jeden peptid vybraný aspoň z jednej zo skupín SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 7 a SEQ ID NO: 10.
10. Vakcínová kompozícia podľa nároku 9, **vyznačujúca sa tým**, že zahŕňa peptidy SEQ ID NO: 14 a SEQ ID NO: 15.

11. Vakcínová kompozícia podľa nárokov 8 až 10, **vyznačujúca sa tým**, že peptidy sú rozpustené v sterilnej vode a prípadná imunostimulačná zlúčenina je rastový faktor granulocytovej makrofágovej kolónie.
12. Vakcínová kompozícia podľa nárokov 8 až 11, **vyznačujúca sa tým**, že zahŕňa adjuvant vybratý zo skupiny monofosforyllipid A (MPL ®), Freundov úplný alebo neúplný adjuvant alebo hydroxid hlinitý.
13. Vakcínová kompozícia, **vyznačujúca sa tým**, že antigén podľa nároku 6 je vytvorený ako lipopeptidový a/alebo lipozómový prípravok.
14. Spôsob detekcie protilátok vyvolaných HIV alebo HIV-špecifickými peptidmi alebo proteínmi vo vzorke telesnej tekutiny, **vyznačujúci sa tým**, že sa na uvedenej vzorke vykoná imunologická skúška, v ktorej je(sú) antigén(y) vybratý(é) z peptidov podľa nárokov 1, 2, 3, 4 a 5.
15. Súprava na imunologickú skúšku na detekciu protilátok vyvolaných HIV alebo HIV-špecifickými peptidmi alebo proteínmi vo vzorke telesnej tekutiny, **vyznačujúca sa tým**, že diagnostickým antigénom je peptid podľa ktoréhokoľvek z predchádzajúcich nárokov 1 až 5.
16. Protilátka **vyznačujúca sa tým**, že je schopná selektívne reagovať s antigénom z nárokov 6 a 7.