

PCTWELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁷ : C07K 14/025, A61K 47/48	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/61616 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 19. Oktober 2000 (19.10.00)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE00/00976 (22) Internationales Anmeldedatum: 3. April 2000 (03.04.00) (30) Prioritätsdaten: 199 16 224.7 10. April 1999 (10.04.99) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): NOVEMBER AKTIENGESELLSCHAFT GESELLSCHAFT FÜR MOLEKULARE MEDIZIN [DE/DE]; Ulrich-Schalk-Strasse 3a, D-91056 Erlangen (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): BERTLING, Wolf [DE/DE]; Meisenweg 22, D-91056 Erlangen (DE). REISER, Christian [DE/DE]; Steinert-Strasse 9, D-96047 Bamberg (DE). WALTER, Jürgen [DE/DE]; Hirschensprung 1, D-91056 Erlangen (DE). (74) Anwalt: GASSNER, Wolfgang; Nägelsbachstrasse 49 A, D-91052 Erlangen (DE).	(81) Bestimmungsstaaten: AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i> <i>Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>	
(54) Title: FRAGMENTS OF VIRUS PROTEIN 2 OR 3 OF THE POLYOMA VIRUS, USED FOR TRANSPORTING ACTIVE INGREDIENTS (54) Bezeichnung: FRAGMENTE DES VIRUS PROTEINS 2 ODER 3 DES POLYMAVIRUS ALS FÄHREN FÜR WIRKSTOFFE (57) Abstract The invention relates to a synthetic, biologically active molecule for fixing an active ingredient to the virus protein 1 (VP1) of the polyoma virus. According to the invention, an amino acid sequence A1 which is derived from the C-terminal end of virus protein 2 (VP2) or 3 (VP3) of the polyoma virus is bonded to an active ingredient at one of its ends. (57) Zusammenfassung Die Erfindung betrifft ein synthetisches biologisch aktives Molekül zum Verankern eines Wirkstoffs am Virusprotein 1 (VP1) des Polyoma-Virus, wobei eine vom C-terminalen Ende des Virusproteins 2 (VP2) bzw. 3 (VP3) des Polyoma-Virus abgeleitete Aminosäuresequenz A1 an ihrem einen Ende mit einem Wirkstoff verbunden ist.		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

FRAGMENTE DES VIRUS PROTEINS 2 ODER 3 DES POLYMAVIRUS ALS FÄHREN FÜR WIRKSTOFFE

Die Erfindung betrifft ein synthetisches biologisch aktives Molekül und ein Verfahren zu dessen Herstellung.

5

Aus Chen, X.S., Stehle, T., und Harrison, S.C. (1998): Interaction of polyomavirus internal protein VP2 with the major capsid protein VP1 and implications for participation of VP2 in viral entry, The EMBO Journal, Vol. 17, No. 12, pp. 3233-
10 3240 sind die für eine Verankerung von den Virusproteinen VP2 bzw. VP3 des Polyomavirus am Virusprotein 1 verantwortlichen Wechselwirkungen bekannt. Danach erfolgt die Verankerung im Bereich des C-terminalen Endes des VP2 bzw. VP3.

15 Aus der US 4,950,599 ist es bekannt, dass das Polyomavirus zum Transport von Wirkstoffen in Zellen geeignet ist. Ferner ist es aus der DE 196 18 797 A1 bekannt, dass ein vom Polyomavirus abgeleitetes Kapsomer sich zum Transport von molekularer Substanz in Zellen eignet.

20

Aus der EP 0 259 149 A2 ist es bekannt, das innere Kapsidprotein VP6 aus Rotavirus als immunologisches Trägermolekül und als Vakzin zur Stimulierung der Immunantwort gegen Rotavirusinfektionen zu verwenden. Dabei werden immunogene Peptide
25 über nicht näher definierte Peptid-Peptidwechselwirkungen an VP6 gebunden. VP6 bildet hier kein strukturiertes Kapsomer, sondern zeigt im Gegenteil einen ausgeprägten strukturellen Polymorphismus. Das VP6 liegt als Monomer oder in oligomerer Form vor. Es können sich aus oligomerem VP6 zwar Partikel
30 bilden. Dabei handelt es sich jedoch nicht um ein Kapsid oder ein Kapsomer, sondern um ein unstrukturiertes Trägerprotein.

In Redmond, M.J. et al. (1991): Rotavirus particles function as immunological carriers for the delivery of peptides from infectious agents and endogenous proteins, Mol. Immunol. 28, 269-278 ist die Verwendung des inneren Kapsidproteins VP6 aus
5 Rotavirus als Transportpartikel bekannt. Dabei ist das VP6 über ein von der Peptidsequenz des rotaviralen Proteins VP4 abgeleitetes Bindepotein an immunogene Peptide oder Proteine gebunden. Ein an die von VP4 abgeleitete Peptidsequenz gekoppeltes Antigen befindet sich an der Außenseite des Transport-
10 partikels und ist daher vor Abbau nicht geschützt.

In GB 22 57 431 A ist die Verwendung eines chimären Proteins beschrieben, das vom Hüllprotein des Phagen MS-2 abgeleitet ist. Dieses Protein kann Kapside bilden. Daran gekoppelte an-
15 tigen Peptide oder dgl. sind an die Außenseite des Kapsids gebunden. Bei einer spontanen Assemblierung des chimären Proteins während der Expression in E.coli besteht ein hohes Kontaminationsrisiko durch bakterielle DNA oder Proteine.

20 Aus der DE 43 35 025 A1 ist ein endosomolytisch wirksames virusähnliches Partikel bekannt, das auf seiner äußeren Oberfläche mit membranaktiven Peptiden modifiziert ist. Die Herstellung dieses Partikels ist aufwendig.

25 Aufgabe der Erfindung ist es, die Nachteile nach dem Stand der Technik zu beseitigen. Es soll insbesondere eine einfache Möglichkeit zur gezielten Assoziation von Wirkstoffen mit VP1 des Polyomavirus angegeben werden.

30 Diese Aufgabe wird durch die Merkmale der Ansprüche 1, 9 und 19 gelöst. Zweckmäßige Ausgestaltungen ergeben sich aus den Merkmalen der Ansprüche 2 bis 8, 10 bis 18 und 20 bis 24.

In der Beschreibung finden die folgenden Definitionen Anwendung:

5 Abgeleitete Aminosäuresequenz: Aminosäuresequenz, die gegenüber der Aminosäuresequenz, von der sie abgeleitet ist, unverändert ist oder sich davon durch Aminosäureaustausche, Insertionen oder Deletionen unterscheidet.

C-terminales Ende: Bereich oder Region am C-Terminus.

10

Synthetisches Molekül: Künstlich hergestelltes Molekül.

Koppeln bzw. Ankoppeln: Kovalentes oder nicht kovalentes Binden. Ein nicht kovalentes Binden kann z.B. über eine Chelat-
15 Bindung erfolgen.

Gentechnik: Technik, die Verfahren zum Einbringen definierter Nukleinsäuren in Zellen umfaßt.

20 Nach Maßgabe der Erfindung ist ein synthetisches biologisch aktives Molekül vorgesehen, wobei eine vom C-terminalen Ende des Virus Proteins 2 (VP2) bzw. 3 (VP3) des Polyomavirus abgeleitete Aminosäuresequenz (A1) mit einem Wirkstoff verbunden ist.

25

Das vorgeschlagene synthetische biologisch aktive Molekül ermöglicht auf einfache Weise die gezielte Assoziation von Wirkstoffen mit VP1 des Polyomavirus. Dabei bildet sich ein strukturiertes Kapsomer aus. Unter Verwendung desselben ist
30 eine einfache Herstellung von Kapsiden als universelle Träger für Wirkstoffe möglich.

Vorteilhafterweise besteht die Aminosäuresequenz (A1) aus 10 bis 55, vorzugsweise aus 28 bis 38, Aminosäuren. Die Beschränkung auf eine relativ kurze Aminosäuresequenz vereinfacht und verbilligt die Herstellung des synthetischen biologisch aktiven Moleküls.

Die Aminosäuresequenz entspricht zweckmäßigerweise zumindest abschnittsweise der VP2-Sequenz von der Aminosäureposition 250 bis 319, vorzugsweise von der Aminosäureposition 260 bis 300, besonders vorzugsweise von der Aminosäureposition 287 bis 297. Diese Aminosäuresequenz gewährleistet eine sichere Verankerung am VP1.

Beim synthetischen biologisch aktiven Molekül weist die Aminosäuresequenz (A1) vorzugsweise Aminosäuren in folgender Sequenz auf:

Trp	Met	Leu	Pro	Leu	Ile	Leu	Gly	Leu	Tyr	Gly
1				5				10		

20

Der Wirkstoff ist vorzugsweise über einen Linker an die Aminosäuresequenz (A1) gebunden. Der Linker kann aus mindestens einer Aminosäure, einem Peptid, Protein, Lipid oder dgl. gebildet sein. Der Wirkstoff kann aus der folgenden Gruppe ausgewählt sein: Nukleinsäure, Oligonukleotid, Protein, Peptid, peptidische Substanz, PNA, Modifikationen der genannten Substanzen und niedermolekulare pharmazeutische Wirkstoffe. Geeignet sind insbesondere solche Wirkstoffe, welche über eine der unten erwähnten reaktiven Gruppen an die Aminosäuresequenz ankoppeln.

30

Das synthetische biologisch aktive Molekül kann gekoppelt an eine von VP1 des Polyomavirus abgeleitete Aminosäuresequenz vorliegen und/oder Bestandteil eines Medikaments sein.

5 Nach weiterer Maßgabe der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung des erfindungsgemäßen synthetischen biologisch aktiven Moleküls mit folgenden Schritten vorgesehen:

a) Bereitstellen einer vom C-terminalen Ende des Virus
10 Proteins 2 (VP2) bzw. 3 (VP3) des Polyomavirus abgeleiteten Aminosäuresequenz (A1), wobei die Aminosäuresequenz (A1) ein Mittel zum Ankoppeln aufweist und

b) Binden des Wirkstoffs über das Mittel zum Ankoppeln
15 an die Aminosäuresequenz (A1).

Das Mittel zum Ankoppeln kann als Aminosäure Glycin, Cystein oder über Lysin gebundenes Glycin aufweisen. Vorteilhafterweise ist das Mittel zum Ankoppeln eine an das N- oder C-
20 terminale Ende der Aminosäuresequenz (A1) gebundene weitere, vorzugsweise synthetisch hergestellte, Aminosäuresequenz (A2).

Das synthetische biologisch aktive Molekül kann, zumindest
25 teilweise, gentechnisch hergestellt werden. Dabei kann die Aminosäuresequenz (A1), die weitere Aminosäuresequenz (A2) und der Wirkstoff ganz oder teilweise gentechnisch hergestellt sein. Die weitere Aminosäuresequenz (A2) weist zweckmäßigerweise Glycine und/oder Aminosäuren mit funktionellen
30 Seitengruppen auf, wobei die funktionellen Seitengruppen aus der folgenden Gruppe ausgewählt sein können: Amino-, Sulfhydryl-, Carboxyl-, Hydroxyl-, Guanidinium-, Phenyl-, Indol-, Imidazol-Rest.

Das Mittel zum Ankoppeln kann eine über eine Aminosäure, vorzugsweise Glycin, Cystein oder über Lysin gebundenes Glycin, an das C- oder N-terminale Ende der Aminosäuresequenz (A1) gebundene reaktive Gruppe sein. Sie kann einen der folgenden Bestandteile aufweisen: Aminosäure mit Monobromacetylrest, Aminosäure mit Monochloracetylrest, Aminosäure mit 3-Nitro-2-Pyridinsulfonylrest (Npys). Die vorgeschlagenen reaktiven Gruppen sind universell einsetzbar. Sie eignen sich zum Ankoppeln einer Vielzahl von Wirkstoffen.

10

Als besonders vorteilhaft hat es sich erwiesen, dass der Wirkstoff über eine Thioether- oder Disulfidbrücken-Bindung an die Aminosäuresequenz (A1) oder an die weitere Aminosäuresequenz (A2) gebunden wird. Die Herstellung einer solchen Bindung läßt sich in der Praxis einfach bewerkstelligen. Selbstverständlich ist auch die Verwendung anderer reaktiver Gruppen denkbar. Z.B. kommt N-Succinimidyl Bromacetat oder N-Succinimidyl 3-(2-pyridyldithio) -propionat (SPDP) in Betracht.

20

Der Wirkstoff kann über einen Linker an die Aminosäuresequenz (A1) oder die weitere Aminosäuresequenz (A2) gebunden werden. Der Linker kann aus mindestens einer Aminosäure, einem Peptid, Protein, Lipid oder dgl. gebildet sein.

25

Nach weiterer Maßgabe der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung des erfindungsgemäßen synthetischen biologisch aktiven Moleküls mit folgenden Schritten vorgesehen:

30

aa) Synthetisieren einer vom C-terminalen Ende des Virus Proteins 2 (VP2) bzw. 3 (VP3) des Polyomavirus abgeleiteten Aminosäuresequenz (A1) und

bb) Ankoppeln und Synthetisieren eines Wirkstoffs, nämlich eines Peptids, an die Aminosäuresequenz (A1),

wobei die Schritte lit. aa und lit. bb mittels Peptidsynthese oder mittels gentechnischer Methoden durchgeführt werden.

Beim Schritt lit. bb wird die Aminosäuresequenz (A1) um den Wirkstoff verlängert. Die Verlängerung bzw. das Ankoppeln des Wirkstoffs erfolgt durch fortgesetztes Ankoppeln von Aminosäureresten. Dieses Verfahren läßt sich besonders einfach durchführen.

Weitere beide vorgenannten Verfahren betreffende vorteilhafte Ausgestaltungen sind aus den Unteransprüchen ersichtlich.

Beispiele:

A. Synthese und Aufreinigung der Peptide:

Peptide werden durch simultane multiple Peptidsynthese (Schnorrenberg, G. und Gerhardt, H. (1989) Tetrahedron 45, 7759) an einem Peptidsynthesizerautomaten (Typ: PSSM-8 der Fa. SHIMADZU, Japan) unter Verwendung der 9-Fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc)/tert. Butyl (But)-Strategie nach Sheppard (Atherton, E. und Sheppard, R.C. (1989) "Solid phase peptide synthesis - a practical approach" IRL Press, Oxford) synthetisiert. Die Kopplungen werden mit jeweils 6 Äquivalenten Fmoc-geschützter Aminosäure/1-Hydroxybenzotriazol (HOBt)/12 Äquivalenten n-Methylmorpholin mit 2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-tetrafluorborat (TBTU) an einem polymeren Trägerharz (Typ: Tentagel S Trityl Harz, RAPP Polymere, Tübingen) bei einer Beladung von 2mmol/g

Harz durchgeführt. Die Peptide enthalten C-terminal eine COOH-Gruppe.

Bei der Synthese finden folgende Schutzgruppen Verwendung:

5 Cys (Trt), Arg (Pbf), Ser (But), Thr (But), Tyr (But), Asp (OBut), Glu (OBut), Asn (Trt), Gln (Trt), Lys (Boc), His(Trt), Trp (Boc) mit Trt: Trityl-, But: t-Butyl, OBut: t-Butylester, Boc: t-Butyloxycarbonyl und Pbf: 2,2,4,6,7-Pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl.

10

Die Abspaltung aller Schutzgruppen wird mit Trifluoressigsäure (TFA)/Thioanisol/Thiokresol (95:2,5:2,5) in 3 h bei Raumtemperatur unter Zusatz von 3% Triisopropylsilan und anschließender Zugabe von 10% Trimethylchlorsilan für 1 h
15 durchgeführt. Die Peptide liegen nach der Lyophilisation in Form ihrer Trifluoressigsäure-Salze vor.

Die Peptide werden mittels präparativer HPLC an einer Bischoff Polyencap 300 Trennsäule, 10µm, 250x16 mm unter Verwendung eines Gradienten von 0,05 % Trifluoressigsäure in
20 Wasser (Laufmittel A) nach 0,05 % Trifluoressigsäure in 80 % Acetonitril/Wasser (Laufmittel B) aufgereinigt.

Alternativ wurde eine Vydac Trennsäule vom Typ 218 TP 101522
25 (10-15 µm, 250x22 mm) mit einem Gradienten von 43-73 % Laufmittel B in 30 min bei einem Fluß von 15 ml/min verwendet.

Mittels Peptid-Synthese wird z.B. die folgende Aminosäuresequenz synthetisiert:

30

Trp Met Leu Pro Leu Ile Leu Gly Leu Tyr Gly

1

5

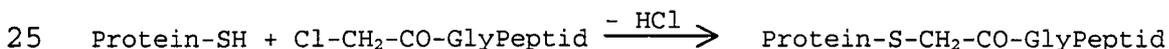
10

An diese Sequenz wird die reaktive Gruppe über eine Aminosäure, vorzugsweise über Glycin, an das N-terminale Ende der Aminosäuresequenz gebunden. Die reaktive Gruppe kann aus Monochloracetyl-Glycin gebildet sein. Alternativ ist es auch
 5 möglich, einen Monobromacetylrest anzukoppeln.

Kopplung von Monochloracetyl-glycin in der Festphasensynthese:

Gleiche Äquivalente Monochloracetyl-glycin und 1-
 10 Hydroxybenzotriazol (HOBt) werden in Dimethylformamid (DMF) gelöst, mit dem gleichen Äquivalent N,N'-Diisopropylcarbodiimid (DIC) gemischt und zu dem Peptidharz gegeben. Monochloracetyl-glycin liegt dabei im Vergleich zum beladenen Peptidharz im Überschuß vor. Die Reaktion erfolgt
 15 unter gelegentlichem Rühren und sollte mindestens 1 h andauern.

Die reaktive Gruppe ermöglicht eine kovalente Bindung des so hergestellten biologisch aktives Moleküls mit einem Wirkstoff, z.B. einem Peptid, das eine freie SH-Gruppe aufweist.
 20 Durch die Reaktion der SH-Gruppe mit dem Chloratom der Monochloracetyl-Gruppe bildet sich eine stabile Thioether Verbindung gemäß der folgenden Reaktionsgleichung:



Konjugatbildung zwischen Monochloracetyl-modifiziertem Ankerpeptid und Peptid mit endständigem Cystein:

30 Monochloracetyl-modifiziertes Ankerpeptid wird im Überschuß gegenüber dem zu konjugierenden Peptid eingesetzt. Die Reaktion erfolgt in 0,1 M NaHCO₃ zwischen pH 7-8 bei RT. Bei ge-

ringer Löslichkeit des Peptids oder des Ankers in wässriger Lösung wird die Konjugatbildung in 4M Guanidinhydrochlorid, pH 8.0 durchgeführt (Lindner, W. und Robey, F.A. (1987) Int. J. Pept. Protein Res. 30, 794-800). Alternativ lässt sich der organische Lösungsmittelanteil, z.B. DMSO im Reaktionsansatz erhöhen. Zur Vermeidung unerwünschter Nebenprodukte können wasserlösliche Phosphine als Reduktionsmittel zugegeben werden.

10 Wahlweise lässt sich die Konjugationsreaktion auch unter folgenden Bedingungen durchführen. Das monochloracetylierte Ankerpeptid und ein Peptid mit endständiger SH-Gruppe werden in 1-Methyl-2-pyrrolidon in Gegenwart eines etwa 10-fachen Überschusses an Diisopropylethylamin und eines ca. 5-fachen Überschusses Tributylphosphin bei RT inkubiert. Nach der Reaktion wird H₂O zugefügt und das Produkt durch Zugabe von Ether präzipitiert und durch Gelfiltration aufgereinigt (Defoort, J.P., Nardelli, B., Huang, W. und Tam, J.P. (1992) Int. J. Protein Res. 40, 214-221).

20 Wahlweise lässt sich die Konjugationsreaktion auch folgendermaßen durchführen. Das die SH-Gruppe enthaltende Peptid wird in 0.2 M Phosphatpuffer, 10 mM EDTA, pH 7.4 gelöst. Hierzu wird das in Dimethylformamid gelöste Monochloracetyl-
25 modifizierte Ankerpeptid gegeben. Nach der Reaktion erfolgt die Aufreinigung durch Gelfiltration oder RP-HPLC (Zhang, L. und Tam, J.P. (1997) J. Am. Chem. Soc. 119, 2363-2370).

Zur Herstellung von isolierten VP1 Pentameren wird VP1 in
30 E.coli als rekombinantes Protein mit einem N-terminalen 6 x Histidin Affinitäts-Tag (=His-Tag) exprimiert. Das Protein wird über eine Ni-NTA Affinitätschromatographie gereinigt.

Der His-Tag wird durch eine Faktor Xa-Behandlung entfernt. Das Protein wird in einem SDS-PAGE-Gel mit anschließender Coomassie-Färbung analysiert.

5 Dieses Ausgangsmaterial (VP1-Protein in 20mM HEPES, pH 7,3, 1 mM EDTA, 200 mM NaCl, 5 % Glycerin) wird in centricon 100 (Amincon) konzentriert und über FPLC-Gelfiltration (Superdex 200) mit einem Laufpuffer (50 mM Tris, 0,15 M NaCl, 5 mM EDTA, pH 8,5) in die hochmolekulare Kapsidfraktion und die
10 Pentamer-Untereinheiten (Molekulargewicht: etwa 225 kD) getrennt. Beide Fraktionen werden in centricon 100 konzentriert. Iodacetamid (SIGMA) wird in einem 10-fach molaren Überschuss zu der die Pentamere enthaltenden Lösung gegeben, um potentiell reaktive SH-Gruppen zu blockieren. Die Reaktion
15 erfolgt für 2 Stunden bei Raumtemperatur. Die modifizierte Pentamerfraktion wird über Gel-Filtration von überschüssigem Iodacetamid getrennt. Mit Hilfe von VP1 spezifischen Antikörpern und einer Affinitätsmatrix (Protein A Support der Firma BIO-RAD) werden VP1-spezifische monoklonale Antikörper adsorbiert.
20 Mit der Antikörper-beschichteten Matrix wird die gereinigte Pentamerfraktion präzipitiert. In einem weiteren Inkubationsschritt wird die Pentamer-Matrix mit der Ankersequenz versetzt. Die Proben werden in einem SDS-Polyacrylamid-Gel (12.5%) analysiert.

25

Konjugatbildung zwischen Npys-modifiziertem Anker-Peptid und Peptid mit endständigem Cystein:

30 Wahlweise kann neben der Reaktion zwischen einem monochlor- oder monobromacetyliertem Ankerpeptid und einem Peptid mit endständigem Cystein unter Ausbildung eines Thioethers die Konjugatbildung zwischen Ankerpeptid und Peptidsequenz auch

über die 3-Nitro-2-pyridinsulphenyl-(=Npys) Gruppe an einem endständigen Cystein des Ankers und einer SH-Gruppe des zu koppelnden Peptids erfolgen. Statt eines monochloracetylierten Glycin wird hierzu ein Npys-modifiziertes Cystein an die Ankersequenz N-terminal gekoppelt. Dabei handelt es sich um ein sogenanntes aktiviertes Disulfid, welches in der Lage ist mit Thiolen, wie z.B. Cysteinen, unter Bildung eines unsymmetrischen Disulfids zu reagieren. Dabei kommt es zur Abspaltung von 3-Nitro-2-thiopyridon, dessen UV Maximum bei 329 nm eine spektroskopische Untersuchung der Kinetik der Reaktion zwischen beiden Verbindungen gestattet.

Für die Reaktion werden folgende Bedingungen gewählt (Albericio, F., Andreu, D., Giralt, E., Navalpotro, C., Pedroso, E., Ponsati, B. und Ruiz-Gayo, M. (1989) Int. J. Peptide Res. 34, 124-128). Das in 0.1 M Natriumacetat, 0.1 M Natriumchlorid, pH 4.5 gelöste zu koppelnde Peptid mit endständiger SH-Gruppe wird mit dem Npys-modifizierten Peptid versetzt, anschließend der pH auf 5.0 eingestellt und für mindestens 12 h unter Rühren inkubiert. Danach wird der pH durch Zugabe von 1N NaOH auf 7.0 eingestellt und nochmals 3 h inkubiert. Nach der Reaktion wird der Ansatz gegen 10 mM NaHCO₃ dialysiert.

Die Reaktion läuft optimal in einem pH Bereich zwischen 4.5 und 7.0 ab. Diese Bedingungen gewährleisten eine Minimierung unerwünschter Nebenreaktionen, wie z.B. die Ausbildung von symmetrischen Disulfiden zwischen den zu koppelnden Peptidmolekülen oder eine Abspaltung der Npys-Gruppe. Das Npys-modifizierte Peptid sollte bei der Reaktion im Überschuß gegenüber dem zu konjugierenden Peptid vorliegen (Albericio, F., Andreu, D., Giralt, E., Navalpotro, C., Pedroso, E.,

Ponsati, B. und Ruiz-Gayo, M. (1989) Int. J. Peptide Res. 34, 124-128).

Beispiele der Erfindung sind in den folgenden Sequenzprotokollen dargestellt:

Das Sequenzprotokoll 1 zeigt eine von VP2 des Polyomavirus, Position 287-297, abgeleitete Aminosäuresequenz. Sie dient im synthetischen biologisch aktiven Molekül als Anker zum Verankern des Wirkstoffs am VP1.

Das Sequenzprotokoll 2 zeigt ein erstes Ausführungsbeispiel eines synthetischen biologisch aktiven Moleküls. Die vom HIV-1 abgeleitete Peptidsequenz entspricht den Positionen 1-21; die als Anker wirkende angekoppelte Aminosäuresequenz besetzt die Positionen 22-33. Sie ist vom VP2 des Polyomavirus abgeleitet.

Im Sequenzprotokoll 3 ist ein weiteres Beispiel für eine als Anker geeignete Aminosäuresequenz gezeigt.

Das Sequenzprotokoll 4 zeigt die Sequenz des VP2 vom Polyomavirus. Daraus sind die als Anker geeigneten Sequenzen zwischen den Positionen 250 und 300 ersichtlich.

In den Sequenzprotokollen 5 und 6 sind weitere synthetische biologisch aktive Moleküle gezeigt. Sie können mit VP1 des Polyomavirus gekoppelt und anschließend zur Behandlung einer HIV-Infektion in die infizierten Zellen eingeschleust werden.

Patentansprüche

1. Synthetisches biologisch aktives Molekül, wobei eine vom C-terminalen Ende des Virus Proteins 2 (VP2) bzw. 3 (VP3) des Polyomavirus abgeleitete Aminosäuresequenz (A1) mit einem Wirkstoff verbunden ist.
2. Synthetisches biologisch aktives Molekül nach Anspruch 1, wobei die Aminosäuresequenz (A1) aus 10 bis 55, vorzugsweise aus 28 bis 38, Aminosäuren besteht.
3. Synthetisches biologisch aktives Molekül nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Aminosäuresequenz (A1) zumindest abschnittsweise der VP2-Sequenz von der Aminosäureposition 250 bis 319, vorzugsweise von der Aminosäureposition 260 bis 300, besonders vorzugsweise von der Aminosäureposition 287 bis 297, entspricht.
4. Synthetisches biologisch aktives Molekül nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Aminosäuresequenz (A1) Aminosäuren in folgender Sequenz aufweist:
- Trp Met Leu Pro Leu Ile Leu Gly Leu Tyr Gly
 1 5 10
5. Synthetisches biologisch aktives Molekül nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der Wirkstoff über einen Linker an die Aminosäuresequenz (A1) gebunden ist.
6. Synthetisches biologisch aktives Molekül nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der Wirkstoff aus der folgenden Gruppe ausgewählt ist: Nukleinsäure, Oligonukleotid, Protein, Peptid, peptidische Substanz, PNA,

Modifikationen der genannten Substanzen und niedermolekulare pharmazeutische Wirkstoffe.

- 5 7. Synthetisches biologisch aktives Molekül nach einem der vorhergehenden Ansprüche gekoppelt an eine von VP1 des Polyomavirus abgeleitete Aminosäuresequenz.
- 10 8. Medikament mit einem synthetischen biologisch aktiven Molekül nach einem der vorhergehenden Ansprüche.
- 15 9. Verfahren zur Herstellung des synthetischen biologisch aktiven Moleküls nach einem der vorhergehenden Ansprüche, mit folgenden Schritten:
 - 20 a) Bereitstellen einer vom C-terminalen Ende des Virus Proteins 2 (VP2) bzw. 3 (VP3) des Polyomavirus abgeleiteten Aminosäuresequenz (A1), wobei die Aminosäuresequenz (A1) ein Mittel zum Ankoppeln aufweist und
 - 25 b) Binden des Wirkstoffs über das Mittel zum Ankoppeln an die Aminosäuresequenz (A1).
- 30 10. Verfahren nach Anspruch 9, wobei das Mittel zum Ankoppeln als Aminosäure Glycin, Cystein oder über Lysin gebundenes Glycin aufweist.
11. Verfahren nach Anspruch 9 oder 10, wobei das Mittel zum Ankoppeln eine an das N- oder C-terminale Ende der Aminosäuresequenz (A1) gebundene weitere, vorzugsweise synthetisch hergestellte, Aminosäuresequenz (A2) ist.
12. Verfahren nach einem der Ansprüche 9 bis 11, wobei das synthetische biologisch aktive Molekül, zumindest teilweise, gentechnisch hergestellt wird.

13. Verfahren nach einem der Ansprüche 9 bis 12, wobei die
weitere Aminosäuresequenz (A2) Glycine und/oder Ami-
5 nosäuren mit funktionellen Seitengruppen aufweist.
14. Verfahren nach Anspruch 13, wobei die funktionellen
Seitengruppen aus der folgenden Gruppe ausgewählt sind:
Amino-, Sulfhydryl-, Carboxyl-, Hydroxyl-, Guanidi-
10 nium-, Phenyl-, Indol-, Imidazol-Rest.
15. Verfahren nach einem der Ansprüche 9 bis 14, wobei das
Mittel zum Ankoppeln eine über eine Aminosäure, vor-
zugsweise Glycin, Cystein oder über Lysin gebundenes
15 Glycin, an das C- oder N-terminale Ende der Aminosäure-
sequenz (A1) gebundene reaktive Gruppe ist.
16. Verfahren nach Anspruch 15, wobei die reaktive Gruppe
einen der folgenden Bestandteile aufweist: Aminosäure
20 mit Monobromacetylrest, Aminosäure mit Monochloracetyl-
rest, Aminosäure mit 3-Nitro-2-Pyridinsulfenylrest
(Npys).
17. Verfahren nach einem der Ansprüche 9 bis 16, wobei der
Wirkstoff über eine Thioether- oder Disulfidbrücken-
25 Bindung an die Aminosäuresequenz (A1) oder an die wei-
tere Aminosäuresequenz (A2) gebunden wird.
18. Verfahren nach einem der Ansprüche 9 bis 17, wobei der
Wirkstoff über einen Linker an die Aminosäuresequenz
30 (A1) oder die weitere Aminosäuresequenz (A2) gebunden
wird.

19. Verfahren zur Herstellung des synthetischen biologisch aktiven Moleküls nach Anspruch 1, mit folgenden Schritten:

5 aa) Synthetisieren einer vom C-terminalen Ende des Virus Proteins 2 (VP2) bzw. 3 (VP3) des Polyomavirus abgeleiteten Aminosäuresequenz (A1) und

10 bb) Ankoppeln und Synthetisieren eines Wirkstoffs, nämlich eines Peptids, an die Aminosäuresequenz (A1),

wobei die Schritte lit. aa und lit. bb mittels Peptidsynthese oder mittels gentechnischer Methoden durchgeführt werden.

15

20. Verfahren nach einem der Ansprüche 9 bis 19, wobei die Aminosäuresequenz (A1) aus 10 bis 55, vorzugsweise aus 28 bis 38, Aminosäuren besteht.

20 21. Verfahren nach einem der Ansprüche 9 bis 20, wobei die Aminosäuresequenz (A1) zumindest abschnittsweise der VP2-Sequenz von der Aminosäureposition 250 bis 319, vorzugsweise von der Aminosäureposition 260 bis 300, besonders vorzugsweise von der Aminosäureposition 287
25 bis 297, entspricht.

22. Verfahren nach einem der Ansprüche 9 bis 21, wobei die Aminosäuresequenz (A1) Aminosäuren in folgender Sequenz aufweist:

30

Trp Met Leu Pro Leu Ile Leu Gly Leu Tyr Gly

1

5

10

23. Verfahren nach einem der Ansprüche 9 bis 18 und 20 bis 22, wobei der Wirkstoff aus der folgenden Gruppe ausgewählt ist: Nukleinsäure, Oligonukleotid, Protein, Peptid, PNA, peptische Substanz und Modifikationen der vorgeannten Substanzen.
- 5
24. Verfahren nach einem der Ansprüche 9 bis 23, wobei das synthetische biologisch aktive Molekül an eine von VP1 des Polyomavirus abgeleitete Aminosäuresequenz gekoppelt wird.
- 10

SEQUENZPROTOKOLL 1

<110> november AG

5 <120> Synthetisches Aminosaeuremolekuel

<130> VP2_Minimal_Sequenz

<140>

10 <141>

<160> 1

<170> PatentIn Ver. 2.1

15

<210> 1

<211> 11

<212> PRT

<213> Polyomavirus sp.

20

<300>

<302> Sequenz abgeleitet von VP2 Position 287-297

<303> EMBO J.

<304> 1998

25 <305> 17/12

<306> 3233-3240

<308> J02288/EMBL

<309> 1995-08-22

30 <400> 1

Trp Met Leu Pro Leu Ile Leu Gly Leu Tyr Gly

1

5

10

SEQUENZPROTOKOLL 2

<110> november AG

<120> Synthetisches Aminosaeuremolekuel

5

<130> Bsp. f. VP2 Anker u. Wirkstoff-Peptid

<140>

<141>

10

<160> 1

<170> PatentIn Ver. 2.1

15

<210> 1

<211> 33

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

20

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Pos. 1-21 RT
aus HIV-1; 22-33 VP2- Sequenz aus Polyoma

<400> 1

25

Leu Ala Glu Asn Arg Glu Ile Leu Lys Glu Pro Val His Gly Val Tyr

1

5

10

15

Tyr Asp Pro Ser Lys Pro Asp Trp Met Leu Pro Leu Ile Leu Gly Leu

20

25

30

30

Tyr

<110> november AG

<120> Synthetisches Aminosaeuremolekuel

5 <130> VP2_Anker Pos. 263-296

<140>

<141>

10 <160> 1

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

15 <211> 34

<212> PRT

<213> Polyomavirus sp.

<300>

20 <302> VP2 Anker abgeleitet von der VP2 Sequenz Position
263-296

<303> EMBO J.

<304> 1998

<305> 17/12

25 <306> 3233-3240

<308> J02288/EMBL

<309> 1995-08-22

<400> 1

30 Gln Asp Glu Ser Gly Glu Val Ile Lys Phe Tyr Gln Ala Gln Val Val
1 5 10 15
Ser His Gln Arg Val Thr Pro Asp Trp Met Leu Pro Leu Ile Leu Gly
20 25 30

Leu Tyr

SEQUENZPROTOKOLL 4

5

<110> november AG

<120> Synthetisches Aminosaeuremolekuel

10

<130> VP2_ProtSeq Polyoma sp.

<140>

<141>

15

<160> 1

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

20

<211> 319

<212> PRT

<213> Polyomavirus sp.

<300>

25

<302> VP2 (Kapsid Protein) , Genlocus PLY2CG, komplettes
Genom der Polyoma Staemme a2 und a3 mit der Accession
Nummer J02288 d. European Molecular Biology Laboratory
(EMBL, Outstation Eur.Bioinform.Inst.)

<303> EMBO J.

30

<304> 1998

<305> 17/12

<306> 3233-3240

<308> J02288/EMBL

<309> 1995-08-22

<400> 1

Met Gly Ala Ala Leu Thr Ile Leu Val Asp Leu Ile Glu Gly Leu Ala
 1 5 10 15

5

Glu Val Ser Thr Leu Thr Gly Leu Ser Ala Glu Ala Ile Leu Ser Gly
 20 25 30

Glu Ala Leu Ala Ala Leu Asp Gly Glu Ile Thr Ala Leu Thr Leu Glu
 10 35 40 45

Gly Val Met Ser Ser Glu Thr Ala Leu Ala Thr Met Gly Ile Ser Glu
 50 55 60

15

Glu Val Tyr Gly Phe Val Ser Thr Val Pro Val Phe Val Ser Arg Thr
 65 70 75 80

Ala Gly Ala Ile Trp Leu Met Gln Thr Val Gln Gly Ala Ser Thr Ile
 85 90 95

20

Ser Leu Gly Ile Gln Arg Tyr Leu His Asn Glu Glu Val Pro Thr Val
 100 105 110

Asn Arg Asn Met Ala Leu Ile Pro Trp Arg Asp Pro Ala Leu Leu Asp
 25 115 120 125

Ile Tyr Phe Pro Gly Val Asn Gln Phe Ala His Ala Leu Asn Val Val
 130 135 140

30

His Asp Trp Gly His Gly Leu Leu His Ser Val Gly Arg Tyr Val Trp
 145 150 155 160

Gln Met Val Val Gln Glu Thr Gln His Arg Leu Glu Gly Ala Val Arg
 165 170 175

Glu Leu Thr Val Arg Gln Thr His Thr Phe Leu Asp Gly Leu Ala Arg
 180 185 190

5 Leu Leu Glu Asn Thr Arg Trp Val Val Ser Asn Ala Pro Gln Ser Ala
 195 200 205

Ile Asp Ala Ile Asn Arg Gly Ala Ser Ser Ala Ser Ser Gly Tyr Ser
 210 215 220

10 Ser Leu Ser Asp Tyr Tyr Arg Gln Leu Gly Leu Asn Pro Pro Gln Arg
 225 230 235 240

Arg Ala Leu Phe Asn Arg Ile Glu Gly Ser Met Gly Asn Gly Gly Pro
 15 245 250 255

Thr Pro Ala Ala His Ile Gln Asp Glu Ser Gly Glu Val Ile Lys Phe
 260 265 270

20 Tyr Gln Ala Gln Val Val Ser His Gln Arg Val Thr Pro Asp Trp Met
 275 280 285

Leu Pro Leu Ile Leu Gly Leu Tyr Gly Asp Ile Thr Pro Thr Trp Ala
 290 295 300

25 Thr Val Ile Glu Glu Asp Gly Pro Gln Lys Lys Lys Arg Arg Leu
 305 310 315

SEQUENZPROTOKOLL 5

30

<110> november AG

<120> Synthetisches Aminosaeuremolekuel

<130> Wirkstoff 1 RT/Teilseq. aus HIV

<140>

<141>

5

<160> 1

<170> PatentIn Ver. 2.1

10

<210> 1

<211> 21

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

15

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Pos. 1-20 RT
aus HIV-1 (Accession Nummer AJ006287) und einem
zusaetzlichen C-terminalen Cys

20

<400> 1

Leu Ala Glu Asn Arg Glu Ile Leu Lys Glu Pro Val His Gly Val Tyr

1

5

10

15

Tyr Asp Pro Ser Cys

25

20

SEQUENZPROTOKOLL 6

<110> november AG

30

<120> Synthetisches Aminosaeuremolekuel

<130> Wirkstoff 2 GAG/Teilseq. aus HIV

<140>

<141>

<160> 1

5

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 17

10

<212> PRT

<213> Human immunodeficiency virus type 1

<220>

<223> Teilsequenz von GAG aus HIV-1 (Accession Nummer

15

AJ006287)

<400> 1

Gly Ser Glu Glu Leu Arg Ser Leu Tyr Asn Thr Val Ala Thr Leu Tyr

1

5

10

15

20

Cys

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 00/00976

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 IPC 7 C07K14/025 A61K47/48

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C07K A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, MEDLINE, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	X.S. CHENG ET AL.: "Interaction of polyomavirus internal protein VP2 with the major capsid protein VP1 and implications for participation of VP2 in viral entry" EMBO JOURNAL, vol. 17, no. 12, 15 June 1998 (1998-06-15), pages 3233-3240, XP002147347 EYNSHAM, OXFORD GB cited in the application page 3237, left-hand column, paragraph 2 -page 3238, right-hand column, paragraph 2; figure 4	1
A	WO 96 11274 A (US HEALTH) 18 April 1996 (1996-04-18) page 4, line 4 -page 5, line 21; claims; examples	1,6

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

° Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

13 September 2000

Date of mailing of the international search report

26/09/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Fuhr, C

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. l. Application No

PCT/DE 00/00976

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DE 195 43 553 A (DEUTSCHES PRIMATENZENTRUM GMBH) 28 May 1997 (1997-05-28) page 2, line 5 - line 9 page 2, line 58 -page 3, line 13; claims; examples -----	1,6
A	WO 94 04686 A (BARSOUM JAMES G ;BIOGEN INC (US); FAWELL STEPHEN E (US); PEPINSKY) 3 March 1994 (1994-03-03) page 5, line 13 -page 7, line 19; claims; examples -----	1,6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
 Information on patent family members

Int. l. Application No

PCT/DE 00/00976

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9611274 A	18-04-1996	US 5618536 A	08-04-1997
		AU 3828495 A	02-05-1996
		AU 717647 B	30-03-2000
		AU 4447899 A	28-10-1999
		EP 1018555 A	12-07-2000
		EP 0789766 A	20-08-1997
		JP 10506796 T	07-07-1998
		US 5855891 A	05-01-1999
DE 19543553 A	28-05-1997	CA 2236159 A	29-05-1997
		WO 9719174 A	29-05-1997
		EP 0862633 A	09-09-1998
		JP 2000500973 T	02-02-2000
WO 9404686 A	03-03-1994	AT 173016 T	15-11-1998
		AU 667244 B	14-03-1996
		AU 5083293 A	15-03-1994
		CA 2135642 A	03-03-1994
		DE 69321962 D	10-12-1998
		DE 69321962 T	01-07-1999
		DE 656950 T	14-03-1996
		EP 0656950 A	14-06-1995
		EP 0903408 A	24-03-1999
		ES 2123062 T	01-01-1999
		FI 945248 A	05-01-1995
		JP 2869396 B	10-03-1999
		JP 10033186 A	10-02-1998
		JP 2702285 B	21-01-1998
		JP 7503617 T	20-04-1995
		KR 153027 B	15-10-1998
		NO 944273 A	17-02-1995
		NZ 255831 A	24-04-1997
		US 5674980 A	07-10-1997
		US 5670617 A	23-09-1997
US 5652122 A	29-07-1997		
US 5747641 A	05-05-1998		

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 00/00976

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
 IPK 7 C07K14/025 A61K47/48

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C07K A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, MEDLINE, CHEM ABS Data

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	X.S. CHENG ET AL.: "Interaction of polyomavirus internal protein VP2 with the major capsid protein VP1 and implications for participation of VP2 in viral entry" EMBO JOURNAL, Bd. 17, Nr. 12, 15. Juni 1998 (1998-06-15), Seiten 3233-3240, XP002147347 EYNHAM, OXFORD GB in der Anmeldung erwähnt Seite 3237, linke Spalte, Absatz 2 -Seite 3238, rechte Spalte, Absatz 2; Abbildung 4	1
A	WO 96 11274 A (US HEALTH) 18. April 1996 (1996-04-18) Seite 4, Zeile 4 -Seite 5, Zeile 21; Ansprüche; Beispiele	1,6
	--- -/--	

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

° Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

13. September 2000

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

26/09/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Fuhr, C

1

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	DE 195 43 553 A (DEUTSCHES PRIMATENZENTRUM GMBH) 28. Mai 1997 (1997-05-28) Seite 2, Zeile 5 - Zeile 9 Seite 2, Zeile 58 -Seite 3, Zeile 13; Ansprüche; Beispiele -----	1,6
A	WO 94 04686 A (BARSOUM JAMES G ;BIOGEN INC (US); FAWELL STEPHEN E (US); PEPINSKY) 3. März 1994 (1994-03-03) Seite 5, Zeile 13 -Seite 7, Zeile 19; Ansprüche; Beispiele -----	1,6

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 00/00976

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9611274 A	18-04-1996	US 5618536 A	08-04-1997
		AU 3828495 A	02-05-1996
		AU 717647 B	30-03-2000
		AU 4447899 A	28-10-1999
		EP 1018555 A	12-07-2000
		EP 0789766 A	20-08-1997
		JP 10506796 T	07-07-1998
		US 5855891 A	05-01-1999
DE 19543553 A	28-05-1997	CA 2236159 A	29-05-1997
		WO 9719174 A	29-05-1997
		EP 0862633 A	09-09-1998
		JP 2000500973 T	02-02-2000
WO 9404686 A	03-03-1994	AT 173016 T	15-11-1998
		AU 667244 B	14-03-1996
		AU 5083293 A	15-03-1994
		CA 2135642 A	03-03-1994
		DE 69321962 D	10-12-1998
		DE 69321962 T	01-07-1999
		DE 656950 T	14-03-1996
		EP 0656950 A	14-06-1995
		EP 0903408 A	24-03-1999
		ES 2123062 T	01-01-1999
		FI 945248 A	05-01-1995
		JP 2869396 B	10-03-1999
		JP 10033186 A	10-02-1998
		JP 2702285 B	21-01-1998
		JP 7503617 T	20-04-1995
		KR 153027 B	15-10-1998
		NO 944273 A	17-02-1995
		NZ 255831 A	24-04-1997
		US 5674980 A	07-10-1997
		US 5670617 A	23-09-1997
US 5652122 A	29-07-1997		
US 5747641 A	05-05-1998		