

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(21) Číslo dokumentu:

2001 - 3621

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **03.04.2000**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **10.04.1999**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **1999/19916224**

(33) Země priority: **DE**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **15.05.2002**
(Věstník č. 5/2002)

(86) PCT číslo: **PCT/DE00/00976**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO00/61616**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:

C 07 K 14/025

A 61 K 47/48

(71) Přihlašovatel:

**NOVEMBER AKTIENGESELLSCHAFT
GESELLSCHAFT FÜR MOLEKULARE MEDIZIN,
Erlangen, DE;**

(72) Původce:

Bertling Wolf, Erlangen, DE;
Reiser Christian, Bamberg, DE;
Walter Jürgen, Erlangen, DE;

(74) Zástupce:

Čermák Karel Dr., Národní třída 32, Praha 1, 11000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Fragmenty virového proteinu 2 nebo 3 polyoma
viru použité pro transport aktivních látek**

(57) Anotace:

Řešení se týká syntetické biologicky aktivní molekuly pro připevnění aktivní složky k virovému proteinu 1 (VP1) polynoma viru. Syntetická biologicky aktivní molekula je tvořena aktivní substancí a aminokyselinovou sekvencí (A1), odvozenou z C-terminálního konce virového proteinu 2 (VP2) nebo 3 (VP3) polyoma viru a aktivní substance je připojena k aminokyselinové sekvenci (A1) tak, že aktivní substance může být asociována s virovým proteinem 1 (VP1) polyoma viru prostřednictvím aminokyselinové sekvence (A1) za tvorby strukturovaného kapsomeru, přičemž aminokyselinová sekvence (A1), připojená k aktivní substanci, není 2 (VP2) nebo 3 (VP3).

Fragmenty virového proteinu 2 nebo 3 polyoma viru použité pro transport aktivních látek

Oblast techniky

Vynález se týká syntetické biologicky aktivní molekuly a způsobu její přípravy.

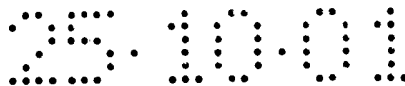
Dosavadní stav techniky

Chen XS, Stehle T a Harrison SC (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, Sv. 17, č. 12, str. 3233-3240, popisují interakce zodpovědné za ukotvení virových proteinů VP2 a VP3 polyoma viru k virovému proteinu 1. Podle řečené publikace se ukotvení děje v oblasti C terminálního konce VP2 nebo VP3.

Patent US 4950599 uvádí, že polyoma virus je vhodný pro transport aktivních látek do buněk. Dále je uváděno v DE 196 18 797 A1, že kapsomer odvozený od polyoma viru je vhodný pro transport molekulárního materiálu do buněk.

Patent EP 0 259 149 A2 uvádí použití rotavirového vnitřního kapsidového proteinu VP6 jako imunologické nosičové molekuly a jako vakcíny ke stimulaci imunitní odpovědi vůči rotavirovým infekcím. Při tomto spojení jsou imunogenní peptidy navázány k VP6 prostřednictvím interakcí peptid-peptid, které nejsou definovány v žádném detailu. VP6 zde netvoří strukturální kapsomer, ale na druhou stranu vykazuje odlišný strukturální polymorfismus. VP6 je přítomný jako monomer nebo v oligomerní formě. Ačkoli oligomerní VP6 může tvořit částice, nejsou tyto částice kapsidami nebo kapsomery, ale jsou nestrukturovanými nosičovými proteiny.

Redmond MJ 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, popisují použití rotavirového vnitřního kapsidového proteinu VP6 jako transportní částice. V tomto spojení je VP6 navázán k imunogenním peptidům nebo proteinům prostřednictvím vazebného proteinu odvozeného od peptidové sekvence rotavirového proteinu VP4. Antigen připojený k peptidové sekvenci odvozené od VP4 je umístěn vně transportní částice, a proto není chráněna od degradace.



GB 22 57 431 A popisuje použití chimérického proteinu, který je odvozen od obalového proteinu fágu MS-2. Tento protein může tvořit kapsidy. Antigenní peptidy nebo podobné sem připojené struktury jsou navázány k vnějšku kapsidy. Spontánní sestavení chimérického proteinu během exprese v E.coli sebou nese vysoké riziko kontaminace bakteriální DNA nebo proteinů.

DE 43 35 025 A1 uvádí endosomolyticky aktivní viru podobnou částici, která byla modifikována membránově aktivními peptidy na vnějším povrchu této částice. Příprava řečené částice je komplikovaná.

Popis vynálezu

Cílem vynálezu je odstranit nevýhody dosavadního stavu techniky. Zejména je zamýšleno poskytnout jednoduchou možnost specifické asociace aktivních substancí s polyoma virem VP1.

Tento cíl je dosažen prostřednictvím charakteristik definovaných v patentových nárocích 1, 9 a 19. Prospěšné formy vynálezu jsou výsledkem charakteristik definovaných patentovými nároky 2 až 8, 10 až 18 a 20 až 24.

V popisu jsou používány následující definice:

Odvozená aminokyselinová sekvence: aminokyselinová sekvence, která je nezměněna ve srovnání s aminokyselinovou sekvencí, z které byla odvozena, nebo která se liší od této sekvence výměnou, inzercí nebo delecí aminokyselin.

C-terminální konec: oblast C terminu.

Syntetická molekula: uměle připravená molekula.

Připojení: kovalentní nebo nekovalentní vazba. Nekovalentní vazba může být vytvořena například prostřednictvím chelátové vazby.

Genetické inženýrství: technika, která zahrnuje způsoby introdukce definovaných nukleových kyselin do buněk.

Ve shodě s vynálezem je poskytnuta biologicky aktivní molekula, kde aminokyselinová sekvence (A1) odvozená od C-terminálního konce virového proteinu 2 (VP2) nebo 3 (VP3) polyoma viru je připojena k aktivní substanci.

Navržená syntetická biologicky aktivní molekula umožňuje jednoduchým způsobem specifickou asociaci aktivních substancí s polyoma virem VP1. To vede k tvorbě strukturovaného kapsomeru. Za použití řečeného kapsomeru je možné připravit jednoduchým způsobem kapsidy jako univerzální nosiče pro aktivní substance.

Aminokyselinová sekvence (A1) obsahuje s výhodou od 10 do 55, přednostně od 28 do 38 aminokyselin. Omezení na relativně krátkou aminokyselinovou sekvenci snižuje cenu a zjednodušuje přípravu syntetické biologicky aktivní molekuly.

Aminokyselinová sekvence v alespoň některých částech odpovídá účelně aminokyselinové pozici 250 až 319 sekvence VP2, přednostně aminokyselinové pozici 260 až 300 a obzvláště přednostně aminokyselinové pozici 287 až 297. Řečená aminokyselinová sekvence zajišťuje bezpečné ukotvení k VP1.

V syntetické biologicky aktivní molekule má aminokyselinová sekvence (A1) přednostně sekvenci aminokyselin uvedenou níže:

Trp Met Leu Pro Leu Ile, Leu Gly Leu Tyr Gly

Aktivní substance je přednostně navázána na aminokyselinovou sekvenci (A1) prostřednictvím spojovací části. Spojovací část může být tvořena alespoň jednou aminokyselinou, peptidem, proteinem, lipidem a podobně. Aktivní substance může být vybrána z následující skupiny obsahující nukleovou kyselinu, oligonukleotid, protein, peptid, peptidickou substanci, PNA, modifikace řečených substancí a nízkomolekulární farmaceuticky aktivní substance. Obzvláště vhodné jsou takové aktivní substance, které jsou připojeny k aminokyselinové sekvenci prostřednictvím jedné z reaktivních skupin uvedených níže. Syntetická biologicky aktivní molekula může být přítomna připojená k aminokyselinové sekvenci odvozené od polyoma viru VP1 a/nebo může být složkou léku.

Dále je ve shodě s vynálezem poskytnut způsob přípravy syntetické biologicky aktivní molekuly, která je předmětem vynálezu, kterýžto způsob má následující kroky:

- a) poskytnutí aminokyselinové sekvence (A1) odvozené od C-terminálního konce virového proteinu 2 (VP2) nebo 3 (VP3) polyoma viru s aminokyselinovou sekvencí (A1) mající spojovací látku a

b) navázání aktivní substance k aminokyselinové sekvenci (A1) prostřednictvím spojovací látky.

Spojovací látka může mít jako aminokyselinu glycin, cystein nebo glycin navázaný prostřednictvím lysinu. Spojovací látka je s výhodou dále, přednostně synteticky připravená aminokyselinová sekvence (A2) navázaná k N- nebo C- terminálnímu konci aminokyselinové sekvence (A1).

Syntetická biologicky aktivní molekula může být připravena alespoň částečně genetickým inženýrstvím. V tomto spojení mohou být aminokyselinová sekvence (A2) a aktivní substance připraveny kompletně nebo částečně genetickým inženýrstvím. Další aminokyselinová sekvence (A2) má účelně glycinu a/nebo aminokyseliny s funkčními postranními skupinami. Funkční skupiny mohou být vybrány z následujících skupin: amino, sulfhydryl, karboxyl, hydroxyl, guanidin, fenyl, indol a imidazolový radikál.

Spojovací látkou může být reaktivní skupina navázaná k C- nebo N-terminálnímu konci aminokyselinové sekvence (A1) prostřednictvím aminokyseliny, přednostně glycinu, cysteinu nebo glycinu navázaného prostřednictvím lysinu. Toto může mít jednu z následujících složek: aminokyselinu s monobromoacetylovým radikálem, aminokyselinu s monochloroacetylovým radikálem, aminokyselinu s 3-nitro-2-pyridinsulfenylovým radikálem (Npys). Navržené reaktivní skupiny mohou být použity univerzálně. Jsou vhodné pro připojení k celé řadě aktivních substancí. Bylo prokázáno jako obzvláště výhodné, že vazba aktivní substance k aminokyselinové sekvenci (A1) nebo k další aminokyselinové sekvenci (A2) prostřednictvím thioéteru nebo disulfidového můstku. V praxi může být tento druh vazby snadno připraven. Použití dalších reaktivních skupin je samozřejmě také možné. Vhodnými skupinami jsou například N-sukcinimidyl bromoacetát nebo N-sukcinimidyl 3-(2-pyridylthio) propinát (SPDP).

Aktivní substance může být navázána k aminokyselinové sekvenci (A1) nebo k další aminokyselinové sekvenci (A2) prostřednictvím spojovací části. Spojovací část může být tvořena alespoň jednou aminokyselinou, peptidem, proteinem, lipidem a podobně. Dále je ve shodě s vynálezem poskytnut způsob přípravy syntetické biologicky aktivní molekuly, která je předmětem vynálezu, kterýžto způsob má následující kroky:

aa) syntéza aminokyselinové sekvence (A1) odvozené od C-terminálního konce virového proteinu 2 (VP2) nebo 3 (VP3) polyoma viru a

bb) připojení a syntéza aktivní substance, zejména peptidu, k aminokyselinové sekvenci (A1),

kde kroky uvedené pod aa) a pod bb) jsou provedeny prostřednictvím syntézy peptidů, nebo pomocí způsobů genetického inženýrství.

V kroku bb) je aminokyselinová sekvence (A1) prodloužena aktivní substancí. Prodloužení a připojení aktivní substance je provedeno opakovaným připojením aminokyselinových reziduí. Tento způsob může být proveden obzvláště snadno.

Další výhodné formy vynálezu týkající se výše zmíněných způsobů mohou být nalezeny v patentových nárocích.

Příklady provedení vynálezu

A. Syntéza a purifikace peptidů:

Peptidy jsou syntetizovány simultánní syntézou mnoha peptidů (Schnorrenberg G a Gerhardt H 1989, Tetrahedron 45, 7759) v peptidovém syntetizačním zařízení (typ: PSSM-8 od společnosti Shimadzu, Japonsko) za použití strategie s 9-fluorenylmetoxykarbonyl (Fmoc/tert. butylem (But) podle Shepparda ((Atherton E, a Sheppard RC (1989) "Solid phase peptide synthesis - a practical approach" IRL Press Oxford). Spojovací reakce jsou provedeny v každém případě 6 ekvivalenty pomocí Fmoc chráněných aminokyselinových/1-hydroxybenzotriazolových (HOBt)/12 ekvivalentů n-metylmorfolinu za použití 12-(1H-benzotriazol -1- yl) -1,1,3,3- tetrametyluronium tetrafluoroborátu (TBTU) na polymerní nosičové pryskyřici (typ: Tentagel S Trityl 2 mmol/g pryskyřice. Peptidy obsahují C-terminální COOH skupinu.

V syntéze jsou používány následující chránící skupiny: Cys (Trt), Arg (Pbf), Ser (But), Thr (But), Asp (Obut), Glu, (Obut), Asn (Trt), Gln (Trt), Lys (Boc), His (Trt), Trp (Boc), kde Trt: trityl, But: t-butyl, Obut: t-butylester, Boc: t-butyloxykarbonyl a Pbf: 2,2,4,6,7-pentametyldihydrobenzofuran -5- sulfonyl.

Všechny chránící skupiny jsou odstraněny za použití trifluoroctové kyseliny (TFA)/thioanizolu/thiokresolu (95:2,5:2,5) při pokojové teplotě po dobu 3 hodin s přidáním 3% triizopropylsilanu a následného přidání 10% trimethylchlorosilanu po dobu 1 hodiny. Po lyofilizaci jsou peptidy přítomny ve formě solí kyseliny trifluoroctové.

Peptidy jsou purifikovány prostřednictvím preparativní HPLC na Bischoffově separační koloně Polyencap 300, 10 μm , 250 x 16 mm, za použití gradientu od 0,05% kyseliny trifluoroctové ve vodě (eluent A) do 0,05% kyseliny trifluoroctové v 80% acetonitrilu/vodě (eluent B).

Alternativně byla použita separační kolona Vydac typ 218 TP 101522 (10-15 μm , 250x22) s gradientem 43-73% eluentu B za 30 minut při průtoku 15 ml/min.

Pomocí peptidové syntézy je syntetizována následující aminokyselinová sekvence, například

Trp Met Leu Pro Leu Ile Leu Gly Leu Tyr Gly

V této sekvenci je reaktivní skupina navázána k N-terminálnímu konci aminokyselinové sekvence pomocí aminokyseliny, přednostně pomocí glycinu. Reaktivní skupina může být tvořena monochloroacetylglycinem. Alternativně je také možné připojit monobromoacetylový radikál.

Připojení monochloroacetylglycinu v syntéze pevné fáze:

Stejně ekvivalenty monochloroacetylglycinu a 1-hydroxybenzotriazolu (HOBT) jsou rozpuštěny v dimethylformamidu (DMF, smíšený se stejným množstvím N,N'-diizopropylkarbodiimidu (DIC) a přidány k peptidové pryskyřici. Ve srovnání s peptidovou pryskyřicí je monochloroacetylglycin přítomný v nadbytku. Reakce je provedena za občasného promíchávání a měla by trvat alespoň 1 hodinu.

Reaktivní skupina usnadňuje vytvoření kovalentní vazby biologicky aktivní molekuly připravené tímto způsobem k aktivní substanci, například k peptidu, který má volnou SH skupinu. Reakce SH skupiny s atomem chlóru monochloroacetylové skupiny vede ke vzniku stabilní thioéterové sloučeniny podle následující rovnice:

$$\text{Protein-SH} + \text{Cl-CH}_2\text{-CO-Gly peptid} \text{ -----HCl-----} \text{protein-S-CH}_2\text{-CO-Gly peptid}$$

Tvorba konjugátu mezi monochloroacetylem modifikovaným kotvicím peptidem a peptidem majícím terminální cystein:

Monochloroacetylem modifikovaný kotvicí peptid je použit v nadbytku peptidu, který má být konjugován. Reakce je provedena v 0,1 M NaHCO_3 při (sic) pH mezi 7-8 při pokojové teplotě. V případě špatné

rozpuštěností peptidu nebo kotvy ve vodném roztoku je tvorba konjugátu provedena ve 4 M guanidin hydrochloridu, pH 8,0 (Lindner W a Robey FA (1987) *Int. J Pept Prot Res* 30, 794-800). Alternativně může být zvýšen poměr organického rozpouštědla, například DMSO v reakční směsi. Abychom vyloučili nechtěné vedlejší produkty, mohou být přidány ve vodě rozpustné fosfiny jako redukční látka.

Volitelně je také možné provést konjugační reakci za následujících podmínek. Monochloroacetylovaný kotvicí peptid a peptid mající terminální SH skupinu jsou inkubovány při pokojové teplotě v 1-metyl-2-pyrolidinu za přítomnosti zhruba 10 násobného nadbytku tributylfosfinu. Po reakci je následně přidána voda a produkt je precipitován přidáním éteru a purifikován gelovou filtrací (Defoort JP, Nardelli B, Huang W a Tam JP (1992). *Int J Prot Res* 40, 214-221).

Volitelně může být konjugační reakce provedena následujícím způsobem. Peptid obsahující SH skupinu je rozpuštěn v 0,2 M fosfátovém pufru, 10 mM EDTA, pH 7,4. K této směsi je přidán monochloroacetylem modifikovaný kotvicí peptid. Po reakci je provedena purifikace gelovou filtrací nebo pomocí RP-HPLC (Zhang L a Tam JP (1997), *J Am Chem Soc* 119, 2363-2370).

Izolované VP1 pentamery jsou připraveny expresí VP1 jako rekombinantního proteinu s N-terminální 6x histidinovou aktivitou tag (=His tag) v *E coli*. Protein je purifikován pomocí Ni-NTA afinitní chromatografie. His tag je odstraněn reakcí s faktorem Xa. Protein je analyzován na SDS-PAGE gelové elektroforéze s následným barvením Coomasie.

Tento výchozí materiál (VP1 protein v 20 mM HEPES, pH 7,3, 1 mM EDTA, 200 mM NaCl, 5% glycerol) je zakonzentrován v centrikonu 100 (Amicon (sic)) a separován pomocí FPLC gelové filtrace (Superdex 200) s elučním puftrem (50 mM Tris, 0,15 M NaCl, 5 mM EDTA, PH 8,5) do vysokomolekulové kapsidové frakce a pentamerových podjednotek (molekulová váha: okolo 225 kD). Obě frakce jsou zakonzentrovány v centrikonu 100. K roztoku obsahujícímu pentamer je přidán jodoacetamid (Sigma) v 10 násobném molárním nadbytku, aby se zablokovaly potenciálně reaktivní SH skupiny. Reakce je prováděna při pokojové teplotě po dobu 2 hodin. Modifikovaná pentamerová frakce je oddělena od nadbytku jodoacetamidu pomocí gelové filtrace. VP1-specifické monoklonální protilátky jsou adsorbovány pomocí VP1-specifických protilátek a afinitní matrice (matrice s proteinem A od

společnosti Bio-Rad). K precipitaci purifikované pentamerové frakce je použita matrice potažená protilátkou. V dalším inkubačním kroku je k pentamerové matici přidána kotvící sekvence. Vzorky jsou analyzovány na SDS polyakrylamidové gelové elektroforéze (12,5%).

Tvorba konjugátu mezi Npys-modifikovaným kotvícím peptidem a peptidem majícím terminální cystein:

Navíc k reakci mezi monochloro- nebo monobromoacetylovaným peptidem peptidem majícím terminální cystein za vzniku thioéteru, může být konjugát mezi kotvícím peptidem a peptidovou sekvencí také volitelně tvořen prostřednictvím 3-nitro -2- pyridinsulfenylové (=Npys) skupiny na terminálním cysteinu kotvy a SH skupinou peptidu, ke kterému má být připojen. K tomuto konci je N-terminálně ke kotvící sekvenci připojen Npys-modifikovaný cystein místo monochloroacetylovaného glycinu. Řečený Npys-modifikovaný cystein je "aktivovaný disulfid", který je schopný reakce s thioley, jako jsou například cysteiny, za vzniku asymetrického disulfidu. To vede k odstranění 3-nitro -2- thiopyridonu, jehož UV maximum při 329 nm umožňuje studium kinetiky reakce mezi dvěma sloučeninami pomocí spektrofotometrie.

Pro reakci jsou zvoleny následující podmínky (Alebericio F, Andreau D, Giralt E, Navalpotro C, Pedroso E, Ponsati B a Ruiz-Gayo M (1989) Int J Peptide Res. 34, 124-128). K peptidu majícímu terminální SH skupinu, ke kterému má být připojen, je přidán Npys-modifikovaný peptid, a je rozpuštěn v 0,1 M octanu sodném, 0,1 M chloridu sodném, pH 4,5, pH je poté upraveno na 5,0 s následnou inkubací s promícháváním po dobu alespoň 12 hodin. Hodnota pH je poté upravena na 7,0 přidáním 1N NaOH s následnou další inkubací po dobu 3 hodin. Po reakci je směs dialyzována proti 10 nM NaHCO₃.

Optimální rozmezí pH reakce je mezi 4,5 a 7,0. Tyto podmínky zajišťují minimalizaci nechtěných vedlejších reakcí, jako jsou například tvorba symetrických disulfidů mezi peptidovými molekulami, které mají být spojeny, nebo odstranění Npys skupiny. Npys modifikovaný peptid by měl být přítomen v reakci v nadbytku nad peptidem, který má být konjugován (Albericio F, Andreau D, Giralt E, Navalpotro C, Pedroso E, Ponsati B a Ruiz-Gayo M (1989) Int J Pept res. 34, 124-128).

Příklady vynálezu jsou ilustrovány v následujícím seznamu sekvencí:

Přehled sekvence 1 uvádí aminokyselinovou sekvenci odvozenou od polyoma viru VP2, pozice 287-297. Slouží v syntetické biologicky aktivní molekule jako kotva pro ukotvení aktivní substance k VP1.

Přehled sekvence 2 uvádí první příkladnou formu vynálezu synteticky biologicky aktivní molekuly. Peptidová sekvence odvozená od HIV 1 odpovídá pozicím 1-21, připojená aminokyselinová sekvence fungující jako kotva zabírá pozice 22-23. Je odvozena z polyoma viru VP2.

Přehled sekvence 3 uvádí další příklad aminokyselinové sekvence vhodné k použití jako kotva.

Přehled sekvence 4 uvádí sekvenci polyoma viru VP2. Ten ukazuje sekvence mezi pozicemi 250 a 300, které jsou vhodné k použití jako kotvy.

Přehledy sekvencí 5 a 6 uvádějí další syntetické biologicky aktivní molekuly. Mohou být spojeny s polyoma virem VP1 a poté pro léčbu HIV infekce mohou být začleněny do infikovaných buněk.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Syntetická biologicky aktivní molekula, kde aminokyselinová sekvence (A1) odvozená z C-terminálního konce virového proteinu 2 (VP2) nebo (3) polyoma viru je připojena k aktivní substanci.
2. Syntetická biologicky aktivní molekula, jak je nárokováno v patentovém nároku 1, kde aminokyselinová sekvence (A1) obsahuje 10 až 55, přednostně 28 až 38 aminokyselin.
3. Syntetická biologicky aktivní molekula, jak je nárokováno v jakémkoli z předcházejících patentových nároků, kde aminokyselinová sekvence (A1) odpovídá alespoň v některých částech VP2 sekvenci aminokyselin 250 až 319, přednostně 260 až 300 a obzvláště přednostně 287 až 297.
4. Syntetická biologicky aktivní molekula, jak je nárokováno v jakémkoli z předcházejících patentových nároků, kde aminokyselinová sekvence (A1) má sekvenci aminokyselin uvedenou níže:

Trp Met Leu Pro Leu Ile Leu Gly Leu Tyr Gly

5. Syntetická biologicky aktivní molekula, jak je nárokováno v jakémkoli z předcházejících patentových nároků, kde aktivní substance je navázána k aminokyselinové sekvenci prostřednictvím spojovací části.
6. Syntetická biologicky aktivní molekula, jak je nárokováno v jakémkoli z předcházejících patentových nároků, kde aktivní substance je vybrána z následující skupiny obsahující nukleovou kyselinu, oligonukleotid, protein, peptid, peptidickou substanci, PNA, modifikace řečených substancí a nízkomolekulární farmaceuticky aktivní substance.
7. Syntetická biologicky aktivní molekula, jak je nárokováno v jakémkoli z předcházejících patentových nároků, připojená k aminokyselinové sekvenci odvozené od polyoma viru VP1.
8. Lék obsahující syntetickou biologicky aktivní molekulu, jak je nárokováno v jakémkoli z předcházejících patentových nároků.
9. Způsob přípravy syntetické biologicky aktivní molekuly, jak je nárokováno v jakémkoli z předcházejících patentových nároků, kterýžto způsob má následující kroky:
 - a) poskytnutí aminokyselinové sekvence (A1) odvozené od C-terminálního konce virového proteinu 2 (VP2) nebo 3 (VP3) polyoma viru s aminokyselinovou sekvencí (A1) mající spojovací látku a
 - b) navázání aktivní substance k aminokyselinové sekvenci (A1) pro prostřednictvím spojovací látky.

10. Způsob, jak je nárokován v patentovém nároku 9, kde aminokyselinou pro navázání je glycin, cystein nebo glycin navázaný prostřednictvím lysinu.
11. Způsob, jak je nárokován v patentovém nároku 9 nebo 10, kde prostředkem pro navázání je další, přednostně synteticky připravená aminokyselinová sekvence (A2) navázaná k N- nebo C-terminálnímu konci aminokyselinové sekvence (A1).
12. Způsob, jak je nárokován v jakémkoli z patentových nároků 9 až 11, kde syntetická biologicky aktivní molekula je připravena alespoň částečně genetickým inženýrstvím.
13. Způsob, jak je nárokován v jakémkoli z patentových nároků 9 až 12, kde další aminokyselinová sekvence (A2) má glycinu a/nebo aminokyseliny s funkčními postranními skupinami.
14. Způsob, jak je nárokován v patentovém nároku 13, kde funkční postranní skupiny jsou vybrány z následující skupiny obsahující amino, sulfhydryl, karboxyl, hydroxyl, guanidin, fenyl, indol a imidazolové radikály.
15. Způsob, jak je nárokován v jakémkoli z patentových nároků 9 až 14, kde prostředkem pro navázání je reaktivní skupina navázaná k C- nebo N- terminálnímu konci aminokyselinové sekvence (A1) prostřednictvím aminokyseliny, přednostně glycinu, cysteinu nebo glycinu navázaného přes lysin.
16. Způsob, jak je nárokován v patentovém nároku 15, kde reaktivní skupina má jednu z následujících složek: aminokyselinu s bromoacetylovým radikálem, aminokyselinu monochloroacetylovým radikálem, aminokyselinu monochloroacetylovým radikálem, aminokyselinu s 3-nitro -2- pyridinsulfenylovým radikálem (Npys).
17. Způsob, jak je nárokován v jakémkoli z patentových nároků 9 až 16, kde aktivní substance je navázána k aminokyselinové sekvenci (A1) nebo k další aminokyselinové sekvenci (A2) prostřednictvím thioéteru nebo disulfidického můstku.
18. Způsob, jak je nárokován v jakémkoli z patentových nároků 9 až 17, kde aktivní substance je navázána k aminokyselinové sekvenci (A1) nebo k další aminokyselinové sekvenci (A2) prostřednictvím spojovací části.
19. Způsob přípravy syntetické biologicky aktivní molekuly, jak je nárokováno v patentovém nároku 1, kterýžto způsob má následující kroky:
 - aa) syntéza aminokyselinové sekvence (A1) odvozené od C-terminálního konce virového proteinu 2 (VP2) nebo 3 (VP3) polyoma viru a
 - bb) připojení a syntéza aktivní substance, zejména peptidu, k aminokyselinové sekvenci (A1),

kde kroky uvedené pod aa) a pod bb) jsou provedeny prostřednictvím syntézy peptidů, nebo pomocí způsobů genetického inženýrství.

20. Způsob, jak je nárokován v jakémkoli z patentových nároků 9 až 19, kde aminokyselinová sekvence (A1) obsahuje 10 až 55, přednostně 28 až 38 aminokyselin
21. Způsob, jak je nárokován v jakémkoli z patentových nároků 9 až 20, kde aminokyselinová sekvence (A1) odpovídá alespoň v některých částech VP2 sekvenci aminokyselin 250 až 319, přednostně 260 až 300 a obzvláště přednostně 287 až 297.
22. Způsob, jak je nárokován v jakémkoli z patentových nároků 9 až 21, kde aminokyselinová sekvence (A1) má sekvenci aminokyselin uvedenou níže:

Trp Met Leu Pro Leu Ile Leu Gly Leu Tyr Gly

23. Způsob, jak je nárokován v jakémkoli z patentových nároků 9 až 18 a 20 až 22, kde aktivní substance je vybrána z následující skupiny obsahující nukleovou kyselinu, oligonukleotid, protein, peptid, peptidickou substanci a modifikace řečených substancí.
24. Způsob, jak je nárokován v jakémkoli z patentových nároků 9 až 23, kde syntetická biologicky aktivní molekula je spojena s aminokyselinovou sekvencí odvozenou z polyoma viru VP1.

13-14-15

25

10

01

PV

2001-3821

Přehled sekvence 1

<110> November AG

<120> Syntetická aminokyselinová molekula

<130> VP2 minimální sekvence

<140>

<141>

<160> 1

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 11

<212> PRT

<213> Polyoma virus sp.

<300>

<302> Sekvence odvozená z VP2 aminokyselin v pozici 282-297

<303> EMBO J.

<304> 1998

<305> 17/12

<306> 3233-3240

<308> J02288/EMBL

<309> 1995-08-22

<400> 1

Trp Met Leu Pro Leu Ile Leu Gly Leu Tyr Gly

Trp Met Leu Pro Leu Ile Leu Gly Leu Tyr Gly

1

5

10

Přehled sekvence 2

<110> November AG

<120> Syntetická aminokyselinová molekula

<130> Př. VP2 kotvícího peptidu a peptidu jako aktivní substance

<140>

<141>

<160> 1

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 33

<212> PRT

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: pozice 1-21 RT z HIV-1; 22-33 VP2 sekvence z polyoma viru

<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 Lys Pro Asp Trp Met Leu Pro Leu Ile Leu Gly Leu

20

25

30

Tyr

Přehled sekvence 3

<110> November AG
 <120> Syntetická aminokyselinová molekula
 <130> VP2 kotva pozice aminokyselin 263-296
 <140>
 <141>
 <160> 1
 <170> PatentIn Ver. 2.1

 <210> 1
 <211> 34
 <212> PRT
 <213> Polyoma virus sp.

 <300>
 <302> VP2 kotva odvozená z VP2 aminokyselin v pozici 263-296
 <303> EMBO J.
 <304> 1998
 <305> 17/12
 <306> 3233-3240
 <308> J02288/EMBL
 <309> 1995-08-22

 <400> 1

 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

Přehled sekvence 4

<110> November AG

<120> Syntetická aminokyselinová molekula

<130> VP2 Protseq poloma sp

<140>

<141>

<160> 1

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 319

<212> PRT

<213> Polyoma virus sp.

<300>

<302> VP2 (kapsidový protein), lokus genu PLY2CG, kompletní genom polyoma virů kmeny a2 a a3 s přístupovým číslem J02288 v European Molecular Biology Laboratory (EMBL, Outstation Eur. Bioinform. Inst.)

<303> EMBO J.

<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

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
 35 40 45

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

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

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
 115 120 125

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

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

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

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
 245 250 255

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

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

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

Přehled sekvence 5

<110> November AG

<120> Syntetická aminokyselinová molekula

Aktivní substance 1 RT/část sekvence z HIV

<140>

<141>

<160> 1

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 21

<212> PRT

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: pozice aminokyselin 1-20 RT z HIV-1
(přístupové číslo AJ006287) a další C-terminální Cys

<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

20



Přehled sekvence 6

<110> November AG

<120> Syntetická aminokyselinová molekula

<130> Aktivní substance 2 GAG/ část sekvence z HIV

<140>

<141>

<160> 1

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 17

<212> PRT

<213> Virus lidské imunodeficiencie typ 1

<220>

<223> Část sekvence GAG z HIV-1 (přístupové číslo AJ006287)

<400> 1

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

1

5

10

15

Cys