

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **034031**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2019.12.20

(21) Номер заявки
201391011

(22) Дата подачи заявки
2012.01.06

(51) Int. Cl. **C07K 14/005** (2006.01)
C07K 14/11 (2006.01)
C07K 14/16 (2006.01)
C07K 14/18 (2006.01)
A61K 39/12 (2006.01)

(54) ДИМЕРНЫЙ ПЕПТИД ДЛЯ ИНДУЦИРОВАНИЯ ИММУННОГО ОТВЕТА ПРОТИВ HIV И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ

(31) **11150323.1; 61/475,988**

(32) **2011.01.06; 2011.04.15**

(33) **EP; US**

(43) **2014.08.29**

(86) **PCT/DK2012/050010**

(87) **WO 2012/092934 2012.07.12**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
БИОНОР ИММУНО АС (NO)

(72) Изобретатель:
**Ланге Эйнар Теннес, Гренвольд Мая
Соммерфельт, Серенсен Биргер (NO),
Лавитц Каролина (SE)**

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) **WO-A2-2011000962
WO-A2-2010056796
UniProtKB/TrEMBL Accession no. C9E989,
entered into UniProtKB 2009.11.03 [Retrieved
from <http://www.uniprot.org/uniprot/C9E989> on
2012.01.26]
EP-A2-1878742
WO-A2-0029008**

(57) Изобретение относится к димерному пептиду для индуцирования иммунного ответа у субъекта против вируса иммунодефицита человека (HIV), содержащему следующие последовательности мономерных пептидов:

GAKRRVVGGCGGAKRRVVQREKRAGEREKRA (SEQ ID NO: 121)
|
GKGGIEEEGGRDRDRGGQDRDR (SEQ ID NO: 147)

где указанные последовательности соединены через C¹⁰ в SEQ ID NO:121 и K² в SEQ ID NO:147, а также к способу его получения и к его применению, в частности к способу индукции иммунного ответа у субъекта против вируса иммунодефицита человека (HIV) и способу снижения и/или замедления патологических эффектов вируса иммунодефицита человека (HIV) у инфицированного им субъекта.

B1**034031****034031****B1**

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к новым пептидам и способам стимуляции гуморального или В-клеточного иммунитета, например, при лечении, диагностике и прогнозе инфекций с патогенами, ассоциированными с инфекционными заболеваниями, включая инфекции HCV, HIV, CMV и Flu, а также антигенами, ассоциированными с аутоиммунными заболеваниями. Изобретение также относится к способам идентификации и обеспечения пептидов, пригодных для стимуляции гуморального или В-клеточного иммунитета, например, при лечении и диагностике таких заболеваний.

Уровень техники

Вакцинация направлена на стимуляцию иммунного ответа на специфический патоген до начала развития инфекции. Когда индивидиум подвергается воздействию такого патогена, то "запускается" ответная реакция иммунологической памяти, которая предупреждает возникновение инфекции. Следовательно, вакцины стимулируют адаптивный иммунный ответ, который в отличие от врожденного иммунитета является длительным и имеет иммунологическую память. Существуют два основных звена адаптивной иммунной системы: гуморальный иммунитет, который включает продукцию антител, которые могут связывать вирусные частицы, и продукцию некоторых антител, которые могут нейтрализовать инфекцию, и опосредованный клетками иммунитет, который приводит к образованию цитотоксических Т-клеток, которые приводят к гибели инфицированных клеток с экспонированными вирусными эпитопами для HLA I класса, элиминируя, таким образом, инфицированные клетки.

Единственным заболеванием, которое было ликвидировано в результате успешной кампании вакцинации, является оспа. В настоящее время прогрессирует кампания для ликвидации полиомиелита. Условиями для вирусных инфекций, с которыми можно бороться вакцинацией, являются такие, когда они вызваны вирусами со стабильными вирусными антигенами (т.е. с очень низким уровнем мутаций, несколькими субтипами), когда отсутствует резервуар в организме других видов животных, когда они не накапливаются в организме после окончания инфекции, и когда вакцинация приводит к длительно существующему иммунитету. Вирусы, такие как возбудители полиомиелита и кори, отвечают этим критериям, в то время как вирусы, такие как вирус гриппа, HCV и HIV, которые изменяют их белковые последовательности - нет. По этой причине необходимы новые и альтернативные подходы для разработки вакцин для этих заболеваний.

Гепатит С является заболеванием печени, которое возникает в результате инфицирования вирусом гепатита С (HCV). Заболевание может различаться по степени тяжести в пределах от заболевания средней тяжести, которое продолжается в течение нескольких недель, до тяжелого заболевания в течение всей жизни. Вирус гепатита С распространяется через кровь; наиболее частой формой передачи является передача многоразовых игл или другого оборудования, используемых для инъекционного введения лекарственных препаратов. Инфекция может быть "острой" или "хронической". Острая инфекция HCV является бессимптомным, непродолжительным заболеванием, которое имеет место в течение первых 6 месяцев после заражения субъекта вирусом гепатита С. У большинства людей острая инфекция приводит к развитию хронической инфекции, которая, в свою очередь, может привести к длительным осложнениям и даже смерти.

Установлено, что 170 млн людей во всем мире заражены HCV, что составляет примерно 3% от всего населения. Также примерно 3-4 млн человек заражаются ежегодно; у 80% вновь зараженных пациентов болезнь переходит в хроническую инфекцию.

HCV представляет вирус с заключенной в оболочку рибонуклеиновой кислотой (РНК) с позитивной цепью диаметром примерно 50 нм, который относится к роду *Hepacivirus* в семействе *Flaviviridae*, который реплицируется в инфицированных клетках. Единственным известным резервуаром для HCV является человек, хотя в экспериментальных условиях вирус передается шимпанзе. Естественными мишенями HCV являются гепатоциты и, возможно, В-лимфоциты. По данным 2008 г. известно шесть различных генотипов и более чем 100 субтипов вируса. Репликация происходит с участием РНК-зависимой РНК-полимеразы, у которой отсутствует функция исправления ошибок, что приводит к очень высокому уровню мутаций. Быстрые мутации в гипервариабельном участке генома HCV, кодирующем белки оболочки, способствуют тому, что вирус избегает контроля иммунной системы хозяина. В результате у большей части зараженных HCV людей развивается хроническая инфекция.

6 генотипов HCV имеют различное географическое распространение. Как правило, заболевание на ранних стадиях является бессимптомным; у большинства пациентов с хронической инфекцией в конечном итоге развиваются осложнения, такие как цирроз печени, и в 1-5% случаев - гепатоцеллюлярная карцинома.

Во всем мире HCV является основной причиной не-А, не-В гепатита. Острая инфекция HCV часто приводит к хроническому гепатиту и циррозу на конечной стадии. Установлено, что примерно у 20% хронических носителей HCV может развиться цирроз в течение периода времени, составляющего примерно 20 лет, и что лица с циррозом имеют риск последующего развития карциномы печени на уровне 1-5%.

Грипп остается значительной причиной заболеваемости и смертности во всем мире. По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) сезонные эпидемии поражают 3-5 млн людей ежегодно

и приводят к смертельным исходам в 250000-500000 случаев. Грипп вызывается вирусами семейства Orthomyxoviridae, которые представляют вирусы с отрицательной цепочкой РНК. Вирус гриппа существует в трех типах А, В и С, из которых только вирус типа А ассоциирован с пандемиями. Вирусы типов А обнаруживаются у людей и животных, в частности у птиц, но также других млекопитающих, таких как свиньи. Вирусы типа А дополнительно подразделяются на субтипы на основе различных видов и комбинаций поверхностных белков вирусов. Среди многих субтипов субтипы гриппа А (H1N1) и А (H3N2) циркулировали среди людей в 2009 г. Вирусы гриппа А и В включены в сезонные вакцины, в то время как грипп С имеет место очень редко, и таким образом, его возбудитель не включается в сезонную вакцину. Вирусы типа В являются специфическими для человека, и вирусы типа С вызывают только заболевание в слабой форме. Геномы ортомиксовирусов являются сегментированными. Вирусы гриппа типа А и В имеют 8 сегментов, в то время как тип С имеет семь сегментов. Пандемии могут возникнуть в результате генетической рекомбинации сегментов генов, когда два различных вируса типа А заражают одну и ту же клетку. Среди населения отсутствует иммунитет к такому новому рекомбинированному вирусу. В 20 веке имели место три пандемии: "испанка" в 1918 г., "азиатский грипп" - в 1957 г. и "гонконский грипп" - в 1968 г. В 1918 г. в результате пандемии погибло 40-50 млн человек во всем мире. Последующие пандемии были значительно слабее, и они привели к гибели 2 млн человек в 1957 г. и 1 млн человек в 1968. В 2009 г. ВОЗ объявила пандемию, вызванную вирусом гриппа H1N1 (свиной грипп), которая была объявлена в августе 2010 г.

Папилломавирусы человека составляют группу ДНК-вирусов семейства Papillomaviridae, которые инфицируют кожу и слизистые. Две группы, происходящие из более чем 100 различных идентифицированных субтипов, являются основной причиной заболеваний, имеющих клиническое значение: которые вызывают бородавки (доброкачественные бородавки и бородавки на половых органах), и группа из 12 субтипов "высокого риска", приводящая к раку шейки матки. Последнюю группу рассматривают в качестве фактора, способствующего развитию почти всех типов рака шейки матки. Во всем мире рак шейки матки остается вторым наиболее частым злокачественным образованием у женщин и ведущей причиной смертности, связанной с раком, женщин в развивающихся странах. С раком шейки матки в основном ассоциированы HPV 16 и 18; однако вирус также является причиной рака горла у мужчин и женщин. HPV передается посредством контакта и поступает в кожу через ссадины. Инфекция при абортах, где экспрессируются только ранние белки, ассоциирована с развитием рака.

Цель изобретения

Целью вариантов осуществления изобретения является обеспечение пептидов, включающих мультимерные пептиды, такие как димерные пептиды, которые можно использовать в качестве иммуногенов для стимуляции гуморального иммунитета у субъекта.

В частности, целью вариантов осуществления изобретения является обеспечение пептидов, включающих мультимерные пептиды, такие как димерные пептиды, содержащие эпитопы антигена, которые стимулируют клетки В-лимфоцитарной линии дифференцировки (В-клетки) к секреции антител к антигену.

Активация В-клеток, обеспеченная пептидами по настоящему изобретению, может быть не зависимой от Т-клеток и зависимой от Т-клеток. Следовательно, пептиды по настоящему изобретению или их фрагменты могут взаимодействовать с рецепторами В-клеток с активацией В-клеток посредством зависимого или не зависимого от Т-клеток-хелперов механизма, приводящего к продукции специфических антител. Кроме того, пептиды могут узнаваться антигенпредставляющими клетками (макрофагами и/или дендритными клетками) таким образом, что эпитопы внутри пептидов правильно процессируются и представляются Т-лимфоцитам, таким как Т-клетки-хелперы, которые, в свою очередь, помогают активировать В-клетки для стимуляции эффективного иммунного ответа. Пептиды также могут приниматься активированными В-клетками, которые также могут функционировать в качестве антигенпредставляющих клеток. Пептиды взаимодействуют с В-клетками через рецептор В-клеток и затем интернализуются внутрь клетки. Эпитопы в пептидах будут процессироваться и представляться Т-лимфоцитам, таким как клетки-хелперы.

Однако в некоторых важных аспектах настоящего изобретения пептиды по настоящему изобретению не предназначены для эффективного проникновения и принятия антигенпредставляющими клетками. Следовательно, в данных аспектах изобретения пептиды по настоящему изобретению могут обеспечивать активацию В-клеток посредством взаимодействия на клеточной поверхности через рецептор В-клеток. Очевидно, понятно, что для обеспечения продолжительной стимуляции В-клеток предпочтительно, чтобы пептиды по настоящему изобретению были сконструированы таким образом, чтобы они содержали эпитоп хелпера, который мог бы приниматься антигенпредставляющими клетками для стимуляции CD4⁺ Т-клеток-хелперов, которые могут поддерживать у субъекта эффективный гуморальный иммунитет.

Кроме того, целью вариантов осуществления изобретения является обеспечение пептидов, которые могут использоваться в качестве антигенов, для обеспечения иммуногенных композиций и способов для индукции иммунного ответа у субъекта против антигена.

Кроме того, целью вариантов осуществления изобретения является обеспечение пептидов, которые

можно использовать в качестве антигенов, которые могут служить в качестве мишеней в диагностических тестах.

Сущность изобретения

Настоящее изобретение относится к пептидной конструкции, способствующей эффективной активации гуморального иммунного ответа против антигенов, входящих в состав данной пептидной конструкции.

Заявителем(ями) настоящего изобретения было установлено, что пептидные конструкции - аминокислотные последовательности с конкретным паттерном или скэффолдом, и в частности, мультимерные пептиды, такие как димерные пептиды данной конструкции, обладают способностью эффективно индуцировать гуморальный иммунный ответ у субъекта в ответ на введение данных пептидов.

Пептидные конструкции по настоящему изобретению были сконструированы как способные к присоединению или связыванию с клеточной поверхностью. Затем пептидные конструкции или их фрагменты могут приниматься антигенпредставляющими клетками (макрофагами и/или дендритными клетками) и стимулировать Т-клетки-хелперы для индукции эффективной и продолжительной зависимой от Т-клеток активации В-клеток. Альтернативно сами В-клетки могут обеспечить индукцию для помощи в активации В-клеток.

Следовательно, пептиды по настоящему изобретению могут проникать в клетки и могут использоваться для нагрузки клеток иммунологически эффективным количеством пептида или фрагментов данного пептида, которое может представляться макрофагами и дендритными клетками. Следовательно, данные пептидные конструкции могут вызывать иммунный ответ цитотоксических Т-лимфоцитов (CTL) и/или гуморальный иммунный ответ.

Таким образом, первый аспект настоящего изобретения относится к димерному пептиду для индуцирования иммунного ответа у субъекта против вируса иммунодефицита человека (HIV), содержащему следующие последовательности мономерных пептидов:

GAKRRVVGGCGGAKRRVVQREKRAGEREKRA (SEQ ID NO: 121)

GKGGIEEEGGRDRDRGGQDRDR (SEQ ID NO: 147)

где указанные последовательности соединены через C¹⁰ в SEQ ID NO:121 и K² в SEQ ID NO:147.

В частности, изобретение относится к указанному димерному пептиду, в котором N- или C-концы последовательностей мономерных пептидов модифицированы амидированием или ацетилированием, предпочтительно где C-концы последовательностей мономерных пептидов представляют собой амиды, более предпочтительно где последовательности мономерных пептидов соединены тиоэфирной связью между C¹⁰ и K².

В предпочтительном варианте осуществления изобретения димерный пептид находится в форме трифторацетатной соли.

Во втором аспекте настоящее изобретение относится к способу получения димерного пептида по изобретению, согласно которому защищенные последовательности мономерных пептидов GAKRRVVGGCGGAKRRVVQREKRAGEREKRA-NH₂ (SEQ ID NO: 121) и GK(бромацетил)GGIEEEGGRDRDRGGQDRDR-NH₂ (SEQ ID NO: 147) реагируют с образованием гетеродимера, причем между K² в SEQ ID NO: 147 и C¹⁰ в SEQ ID NO: 121 образуется тиоэфирная связь.

В третьем аспекте настоящее изобретение относится к композиции для индуцирования иммунного ответа у субъекта против вируса иммунодефицита человека (HIV), содержащей димерный пептид по изобретению, предпочтительно содержащей фармацевтически приемлемый разбавитель или носитель, более предпочтительно содержащей адъювант.

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к вакцине, содержащей композицию по изобретению в форме жидкого раствора или суспензии.

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к применению димерного пептида по изобретению в диагностическом анализе вируса иммунодефицита человека (HIV) *in vitro*, который представляет собой ELISA.

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к способу индукции иммунного ответа у субъекта против вируса иммунодефицита человека (HIV), который включает введение субъекту димерного пептида по изобретению.

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к способу снижения и/или замедления развития патологических эффектов вируса иммунодефицита человека (HIV) у инфицированного им субъекта, который включает введение субъекту терапевтически эффективного количества димерного пептида по изобретению.

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к образцу мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC), стимулированных димерным пептидом по изобретению, для анализа активности цитотоксических Т-клеток (CTL) или хелперных Т-лимфоцитов (HTL).

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к способу оценки иммуногенности вакцины с димерным пептидом по изобретению, согласно которому получают образец мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC) пациента, которому введена указанная вакцина, и определяют в полу-

ченном образце РВМС эпитопспецифические CTL или HTL, присутствие которых свидетельствует об иммуногенности вакцины.

Подробное описание изобретения

Определения.

Когда термины, такие как "один", "а" или "an" используются в данной заявке, то они означают "по меньшей мере" или "один или более", если не указано иначе. Кроме того, термин "содержащий" предназначен для обозначения "включающий" и, таким образом, позволяет присутствие других составляющих, признаков условий или стадий, которые недвусмысленно цитируются.

В том смысле, в котором в данном документе используется термин "мультимерный пептид" или "олигомерный пептид", он относится к сборной конструкции из двух или более различных или идентичных линейных пептидных субъединиц, предпочтительно соединенных друг с другом или собранных посредством одной или более химической связи или линкера. Предпочтительно пептидные последовательности связаны друг с другом посредством одной или более связей, таких как одна ковалентная связь, такая как межмолекулярная дисульфидная связь (S-S) между двумя остатками Cys, метилированная пептидная связь между боковой цепью N-ε-метилированного Lys и боковой цепью остатков Asp или Glu, оксимная связь или тиоэфирная связь. Термин включает димерный (или димер) пептид, соответственно образованный химическим соединением двух линейных пептидных последовательностей. Термин "мультимерный пептид" включает сборную конструкцию из 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 различных или идентичных пептидных последовательностей. В некоторых вариантах осуществления мультимерный пептид является димерным пептидом.

В том смысле, в котором в данном документе используется термин "линкер", он относится к любому соединению, подходящему для сборки двух или более различных или идентичных линейных пептидных последовательностей или субъединиц в мультимерный пептид. Термин включает любой линкер, признанный как подходящий в области химии пептидов. Поскольку мультимерный пептид может быть собран или соединен обычными пептидными связями линейным путем, то термин линкер также включает "пептидный спейсер", также называемый "спейсером".

В некоторых вариантах осуществления линкер не является пептидной последовательностью. В некоторых вариантах осуществления линкер не является разветвленной пептидной последовательностью.

В некоторых вариантах осуществления линкер сам по себе не содержит пептидную последовательность, полученную из или идентичную природному антигену.

В некоторых вариантах осуществления линкер имеет молекулярную массу ниже чем 10 кДа, например ниже чем 9 кДа, например ниже чем 8 кДа, например ниже чем 7 кДа, например ниже чем 6 кДа, например ниже чем 5 кДа, например ниже чем 4 кДа, например ниже чем 3 кДа, например ниже чем 2 кДа, например ниже чем 1,5 кДа, например ниже чем 1 кДа, например ниже чем 0,5 кДа, например ниже чем 0,2 кДа. В некоторых вариантах осуществления в тех случаях, когда мультимерный пептид является димерным пептидом, то линкер не связывает две пептидные последовательности от одного концевой цистеина в первом пептиде со вторым концевым цистеином во втором пептиде.

В некоторых вариантах осуществления линкер не связывает две или более пептидных последовательности через концевой цистеин в любом одном из пептидов.

В некоторых вариантах осуществления линкер не связывает из остатка цистеина.

В некоторых вариантах осуществления в пептиде по настоящему изобретению X^1 , X^3 и необязательная группа X^5 в одном и том же пептиде не являются идентичными по последовательности.

В некоторых вариантах осуществления в пептиде по настоящему изобретению X^2 , X^4 и необязательная группа X^6 в одном и том же пептиде не являются идентичными по последовательности.

В некоторых вариантах осуществления в мультимерном пептиде по настоящему изобретению X^1 , X^3 и необязательная группа X^5 в одном пептиде не являются идентичными по последовательности с X^1 , X^3 и необязательной группой X^5 в любом другом пептиде.

В некоторых вариантах осуществления в мультимерном пептиде по настоящему изобретению X^2 , X^4 и необязательная группа X^6 в одном пептиде не являются идентичными по последовательности с X^2 , X^4 и необязательной группой X^6 в любом другом пептиде.

В общем "HIV" означает вирус иммунодефицита человека.

"Заболевание HIV" состоит из нескольких стадий, включающих острую ВИЧ-инфекцию, которая часто проявляется в виде гриппоподобной инфекции, и симптоматическое заболевание на ранней и средней стадиях, которое имеет несколько нехарактерных симптомов, таких как высыпания на коже, утомляемость, ночное потоотделение, незначительная потеря массы тела, язвы в ротовой полости и грибковые инфекции кожи и ногтей. У большинства пациентов с ВИЧ-инфекцией проявляются слабые симптомы, такие как были указаны выше, перед развитием более тяжелого заболевания. В общем, полагается, что требуется от пяти до семи лет для проявления первых слабовыраженных симптомов заболевания. По мере прогрессирования ВИЧ-инфекции некоторые субъекты становятся практически больными, даже если им еще не поставлен диагноз СПИДа (см. ниже), поздняя стадия ВИЧ-инфекции. Типичные проблемы включают хронический афтозный стоматит в ротовой полости и молочницу во влагалище (грибковая сыпь или пятна), рецидивирующие герпесные пузыри в ротовой полости (герпес) или на половых

органах, стойкая лихорадка, персистентная диарея и значительная потеря массы тела. "СПИД" является поздней стадией ВИЧ-инфекции и представляет собой состояние, которое прогрессивно снижает функциональную активность иммунной системы и делает субъектов восприимчивыми к оппортунистическим инфекциям и опухолям.

В том смысле, в котором в данном документе используется термин "проникающий в клетку пептид", он относится к пептиду, обладающему способностью проникать через плазматическую мембрану в цитоплазматический и/или ядерный компартменты эукариотических и/или прокариотических клеток, например в цитоплазму, ядро, лизосому, эндоплазматический ретикулум, аппарат Гольджи, митохондрии и/или хлоропласты, вероятно, независимо от энергии. Такая способность "проникающего в клетку пептида" проникать через плазматическую мембрану может быть неинвазивной, независимой от энергии, ненасыщаемой и/или независимой от рецептора. В одном варианте осуществления "проникающий в клетку пептид" относится к пептиду, который проявляет способность к транслокации через плазматическую мембрану, что определяется тестом, приведенным в примерах. В том смысле, в котором в данном документе используется термин "не проникающий в клетку пептид", он относится к пептиду, который не является проникающим в клетку пептидом.

В том смысле, в котором в данном документе используется термин "полученный из антигена" по отношению к пептиду, полученному из источника (такого как вирус и т.д.), он относится к пептиду, который получен (например, выделен, очищен и т.д.) из источника. Как правило, пептид адаптирован или модифицирован из оригинального источника. Предпочтительно пептид может быть получен методами генной инженерии и/или синтезирован химическим путем для того, чтобы быть, по существу, идентичным природному пептиду из того или иного источника. Термин включает применение вариантов известных природных пептидных последовательностей, таких как пептидные последовательности, в которых 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 аминокислот природной пептидной последовательности замещены любой другой аминокислотой, например в результате консервативной замены. Альтернативно 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 аминокислот удалены или добавлены в природную пептидную последовательность. Следовательно, в некоторых вариантах осуществления пептиды по настоящему изобретению содержат последовательности X^2 , и/или X^4 , и/или X^6 , которая определяется как последовательность из 5-17 аминокислот, полученных из антигена, где пептидная последовательность антигена содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 замен, добавлений или делеций в сравнении с антигеном, например добавление аргинина в N- или C-конец аминокислотной последовательности X^2 , и/или X^4 , и/или X^6 . Аминокислоты, используемые в аминокислотных последовательностях по изобретению, могут находиться в L- и/или D-форме. Очевидно, понятно, что обе L- и/или D-формы можно использовать для различных аминокислот в одной и той же пептидной последовательности. В некоторых вариантах осуществления аминокислоты в пептидной последовательности находятся в L-форме, которую имеют природные аминокислоты. Очевидно, понятно, что любой известный антиген может использоваться в конструкциях по настоящему изобретению.

В некоторых конкретных вариантах осуществления первые 1, 2 или 3 аминокислоты в N-конце аминокислотных последовательностей по изобретению находятся в D-форме. Полагается, что при этом N-конец усечен, и тем самым деградация пептидов несколько замедляется при наличии аминокислот в D-форме в N-конце таких проникающих в клетку пептидов. Альтернативно и в некоторых вариантах осуществления первые 1, 2 или 3 аминокислоты в N-конце аминокислотных последовательностей по изобретению представляют аминокислоты в бета- или гамма-формах. Бета-аминокислоты содержат их аминогруппу, которая в большей степени связана с бета-углеродом, чем с альфа-углеродом, как это имеет место в 20 обычных природных аминокислотах. Подстрочный индекс заглавной D-буквы после буквы, представляющий аминокислотный остаток, обозначает аминокислоты, определенные как находящиеся в D-форме, например, W_D относится к триптофану в D-форме. Подстрочный индекс заглавной L-буквы после буквы, представляющий аминокислотный остаток, обозначает аминокислоты, определенные как находящиеся в L-форме, например, W_L относится к триптофану в L-форме.

Альтернативно первые 1, 2 или 3 аминокислоты в N-конце аминокислотных последовательностей по изобретению могут быть модифицированы включением атома фтора, или альтернативно используются циклические аминокислоты или другие подходящие аминокислоты, отличные от природных аминокислот.

Очевидно, понятно, что для мультимерных пептидов одна или более, например все пептидные цепи, могут содержать модифицированные аминокислоты в N-конце аминокислотных последовательностей. Линкер, связывающий две или более пептидных цепи, может находиться в любом месте в пептидной цепи, в частности, если одна или более пептидных цепей содержат модифицированные аминокислоты в N-конце аминокислотных последовательностей. Линкер также может служить для защиты пептида от деградации, который часто подвергается деградации с N-конца. Следовательно, размещение линкера может быть более свободным, если одна или обе пептидные цепи защищены от деградации.

Термины "вариант" или "аналог" пептида относятся к пептиду, имеющему аминокислотную последовательность, которая, по существу, идентична стандартному пептиду, как правило, природному или "исходному" полипептиду. Вариант пептида может содержать аминокислотные замены, делеции и/или инсерции в некоторых положениях в природной аминокислотной последовательности.

"Консервативные" аминокислотные замены представляют замены, в которых аминокислотный остаток замещен аминокислотным остатком, имеющим боковую цепь с аналогичными физико-химическими свойствами. В данной области известны семейства аминокислотных остатков, имеющих аналогичные боковые цепи, и они включают аминокислоты с основными боковыми цепями (например, лизин, аргинин, гистидин), кислые боковые цепи (например, аспарагиновая кислота, глутаминовая аминокислота), незаряженные полярные боковые цепи (например, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин, триптофан), неполярные боковые цепи (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин), бета-разветвленные боковые цепи (например, треонин, валин, изолейцин) и ароматические боковые цепи (например, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин). Конкретная форма консервативных аминокислотных замен включает замены на аминокислоты, которые не входят в число обычных 20 аминокислот, кодированных генетическим кодом. Поскольку предпочтительные варианты осуществления настоящего изобретения включают применение синтетических пептидов, то не является проблематичным обеспечить такие "не встречающиеся в природе" аминокислотные остатки в пептидах, раскрытых в данном документе, и тем самым возможно заменить природные насыщенные углеродные цепи в боковых цепях аминокислотных остатков на более короткие или более длинные насыщенные углеродные цепи, например лизин можно заменить аминокислотой, содержащей боковую цепь $-(CH_2)_nNH_3$, где n отличается от 4, и аргинин может быть заменен аминокислотой, содержащей боковую цепь $(CH_2)_nNHC(=NH_2)NH_2$, где n отличается от 3 и т.д. Аналогично кислые аминокислоты, такие как аспарагиновая кислота и глутаминовая кислота, могут быть замещены аминокислотными остатками, содержащими боковые цепи $-(CH_2)_nCOOH$, где $n > 2$.

Термин "по существу, идентична" по отношению к двум аминокислотным последовательностям означает, что последовательности, когда они оптимально выровнены, например, с использованием программ GAP или BESTFIT, с использованием масс гэпов по умолчанию, разделяют по меньшей мере примерно 50, по меньшей мере примерно 60, по меньшей мере примерно 70, по меньшей мере примерно 80, по меньшей мере примерно 90, по меньшей мере примерно 95, по меньшей мере примерно 98 или по меньшей мере примерно 99%-ную идентичность последовательностей. В некоторых вариантах осуществления при определении идентичности последовательностей между двумя различными пептидными последовательностями допускается гэп одной или двух аминокислот, когда две пептидные последовательности выровнены без оказания какого-либо влияния на показатель идентичности последовательностей. В некоторых вариантах осуществления положение остатка, который не является идентичным, различается только по консервативной аминокислотной замене. Как правило, идентичность последовательностей определяют с использованием программного обеспечения для анализа последовательностей. Программное обеспечение для анализа последовательностей сопоставляет аналогичные последовательности с использованием показателей сходности, установленные за счет различных замен, делеций и других модификаций, включая консервативные аминокислотные замены. Например, широко известное программное обеспечение GCG содержит программы, такие как "Gap" и "BestFit", которые можно использовать с параметрами по умолчанию для определения гомологии последовательностей или идентичности последовательностей между близко связанными полипептидами, такими как гомологичные полипептиды от различных видов организмов или между белком дикого типа и его мутантом (см., например, GCG версия 6.1). Полипептидные последовательности также можно сравнить с использованием FASTA или ClustalW, применяя умолчание или рекомендованные параметры. Программа GCG версия 6.1, FASTA (например, FASTA2 и FASTA3) обеспечивает выравнивания и идентичность последовательностей в процентах для областей, наилучшим образом перекрывающихся между запрашиваемой и поисковой последовательностями (Pearson, *Methods Enzymol.*, 1990, 183:63-98; Pearson, *Methods Mol. Biol.*, 2000, 132:185-219). Другим предпочтительным алгоритмом, когда сравнивается последовательность с базой данных, содержащей большое количество последовательностей от различных организмов, является компьютерная программа BLAST, в частности blastp, с использованием параметров по умолчанию (см., например, Altschul et al., *J. Mol. Biol.*, 1990, 215:403-410; Altschul et al., *Nucleic Acids Res.*, 1997, 25:3389-3402 (1997)); каждый из этих источников включен в данный документ для сведения. "Соответствующими" аминокислотными положениями в двух, по существу, идентичных аминокислотных последовательностях являются последовательности, выровненные с использованием одной из программ для анализа белков, упомянутых в данном документе, обычно с использованием параметров по умолчанию.

"Выделенная" молекула является молекулой, которая представляет преобладающий вид в композиции, что было установлено в отношении класса молекул, к которой она относится (т.е. она составляет по меньшей мере примерно 50% типа молекулы в композиции и обычно будет составлять по меньшей мере примерно 70%, по меньшей мере примерно 80%, по меньшей мере примерно 85%, по меньшей мере примерно 90%, по меньшей мере примерно 95% или более видов молекул, например, пептида в композиции). Обычно композиция определенной пептидной последовательности будет показывать 98-99% гомогенность для пептидов в отношении всех присутствующих пептидных молекул в композиции или, по меньшей мере, в отношении, по существу, активных пептидных молекул с учетом предлагаемого применения.

В том смысле, в котором в данном документе используется "линейная последовательность", он от-

носятся к определенной последовательности аминокислот, соединенных обычными пептидными связями в обычном направлении от N-конца к С-концу. Пептид может содержать только пептидные связи. Однако в некоторых вариантах осуществления вторая часть пептидной последовательности может быть связана с и продолжаться от боковой цепи концевой аминокислоты в первой части аминокислотной последовательности. Также термин не исключает того, что аминокислота в последовательности, такой как X^1 , X^2 , X^3 , X^4 и/или X^5 , может быть связана, например, через боковые цепи, с другой аминокислотой в отдаленном положении в пептидной последовательности, например в отдаленном положении в X^1 , X^2 , X^3 , X^4 и/или X^5 .

В контексте настоящего изобретения "лечение" или "проводить лечение" относится к предупреждению, ослаблению, контролю, излечению или подавлению одного или более симптомов или клинически выраженных проявлений заболевания или расстройства, если по контексту не указано иначе. Например, "лечение" пациента, у которого отсутствуют симптомы или клинически выраженные проявления заболевания или расстройства, является превентивным или профилактическим лечением, в то время как "лечение" пациента, у которого имеются симптомы или клинически выраженные проявления заболевания или расстройства, в общем, не является превентивным или профилактическим лечением.

Термин "антиген" означает субстанцию вещества, которое специфически распознается компонентами иммунной системы (антителами, Т-клетками).

Термин "иммуноген" в контексте настоящего изобретения предназначается для обозначения субстанции вещества, которое способно индуцировать адаптивный иммунный ответ у субъекта, где указанный адаптивный иммунный ответ нацелен на иммуноген. По отношению к настоящему изобретению иммуноген будет индуцировать гуморальный и/или опосредованный клетками иммунный ответ. Другими словами иммуноген является антигеном, который способен индуцировать иммунитет.

Термины "эпитоп", "антигенная детерминанта" и "антигенный сайт" используются в данном документе взаимозаменяемо и означают область в антигене или иммуногене, которая распознается антителами (в случае эпитопов, связывающихся с антителами, также известных как "эпитопы В-клеток") или рецепторами Т-клеток, когда эпитоп образует комплекс с молекулой МНС (в случае эпитопов, связывающихся с рецепторами, также известных как "эпитопы Т-клеток").

"Антиген В-клеток" означает антиген, который существует в природе или может быть сконструирован для распознавания В-клеткой и который "запускает" иммунный ответ в В-клетке (например, антиген, который специфически распознается рецептором В-клетки на В-клетке).

Термин "иммунологически эффективное количество" имеет его обычное значение, понимаемое в данной области, т.е. количество иммуногена, которое способно индуцировать иммунный ответ, который достоверно связывает патогенные агенты, которые разделяют иммунологические признаки с иммуногеном.

Термин "вакцина" используется для композиции, содержащей иммуноген, и которая способна индуцировать иммунный ответ, который может снижать риск развития патологического состояния или может индуцировать терапевтически эффективный иммунный ответ, который может помочь вылечить (или, по меньшей мере, ослабить симптомы) патологическое состояние.

Термин "фармацевтически приемлемый" имеет его обычное значение, понимаемое в данной области, т.е. используется для вещества, которое является общепринятым в качестве части лекарственного препарата для применения у людей, когда лечится данное заболевание, и таким образом термин фактически исключает применение высокотоксичных веществ, которые будут в большей степени ухудшать, чем улучшать состояние пациента, который подвергается лечению.

"Эпитоп Т-лимфоцитов-хелперов" (T_H эпитоп), "эпитоп Т-хелпера" или "эпитоп хелпера" представляет пептид, который связывается с молекулой МНС II класса и может быть представлен на поверхности антигенпредставляющей клетки (АРС), связанной с молекулой МНС II класса. В общем, "иммунологический носитель" представляет субстанцию вещества, которое включает один или более T_H эпитопов и которое повышает иммунный ответ к антигену, с которым оно связано с обеспечением активации и пролиферации Т-лимфоцитов-хелперов. Примерами известных иммунологических носителей являются столбнячный и дифтерийный токсиды и гемоцианин моллюсков (KLH).

В дизайне скэффолда по настоящему изобретению X^2 , X^4 и X^6 определяют последовательность из 5-17 аминокислот, полученную из антигена. Последовательность аминокислот, полученная из антигена, может относиться в данном документе к эпитопу.

Пептиды по настоящему изобретению могут представлять индуцирующий Т-лимфоцит-хелпер (НТЛ) пептид, содержащий эпитопы НТЛ. "Индукующий НТЛ пептид" представляет пептид, связывающийся с HLA II класса, который способен индуцировать HLA-ответ. Также пептиды по настоящему изобретению в других вариантах осуществления могут представлять индуцирующие СТЛ пептиды, содержащие СТЛ эпитопы, в дополнении к или альтернативно к индуцирующему НТЛ пептиду. "Индукующий СТЛ пептид" представляет пептид, связывающийся с HLA I класса, который способен индуцировать СТЛ-ответ.

В других альтернативных вариантах осуществления триптофан и производные триптофана используются в последовательности, определенной X^1 , X^3 или X^5 . Могут использоваться любые подходящие

производные триптофана. В том смысле, в котором в данном документе используется термин "производные триптофана", он означает модифицированный аминокислотный остаток триптофана, отличный от природного, включая раскрытые в патенте США № 7232803, такие как три-трет-бутилтриптофан, ди-трет-бутилтриптофан, 7-бензилокситриптофан, гомотриптофан, 5'-аминоэтилтриптофан (промышленно доступный как ЕМОС-производное с боковой цепью Вое и N-альфа от RSP Amino Acids Analogues Inc., Бостон, Mass., США), N-ацетилгомотриптофан (Toronto Research), 7-бензилокситриптофан (Toronto Research), гомотриптофан (Toronto Research) и остатки триптофана, которые замещены в 1-, 2-, 5- и/или 7-положении индольного кольца, где положения 1 или 2 являются предпочтительными, например 5'-гидрокситриптофан.

Термин "производное аминокислоты", иногда используемое в контексте "их производное", относящееся к определенной аминокислоте, означает производное аминокислоты, в котором одна или более химических групп модифицированы, добавлены или удалены, по сравнению с аминокислотой, для которой соединение аминокислоты является производным, по-прежнему содержащим аминогруппу и карбоксильную группу, а также боковую цепь аминокислоты и по-прежнему способным к образованию пептидных связей. В некоторых вариантах осуществления производное аминокислоты представляет обычную аминокислоту, которая модифицирована только в боковой цепи аминокислоты. В некоторых вариантах осуществления производное аминокислоты представляет аминокислоту, отличную от природной, такую как Dpr. В некоторых вариантах осуществления производное аминокислоты представляет модифицированную группу, которая включена в химически синтезированный пептид или полипептид и которая содержит активируемую группу, которая является связываемой после активации с другим пептидом, такая как Dpr(Ser), Lys(Ser) или орнитин(Ser).

Термин "ответ антител" относится к продукции антител (например, IgM, IgA, IgG), которые связываются с интересующим антигеном, где эта реакция определяется, например, анализом сыворотки ELISA с антигеном.

В том смысле, в котором в данном документе используется термин "адъювант", он относится к любому соединению, которое при введении вместе или одновременно с антигеном неспецифически усиливает иммунный ответ к этому антигену. Приведенные в качестве примера адъюванты включают, не ограничиваясь этим, адъюванты на основе эмульсии масло-в-воде и вода-в-масле, адъюванты на основе алюминия (например, AlOH, AlPO₄ и т.д.) и монтанид ISA 720.

Термины "пациент" и "субъект" относятся к любому человеку или животному, которое можно лечить с использованием способов по настоящему изобретению.

В том смысле, в котором в данном документе используется термин "иммунный ответ", он относится к реактивности иммунной системы организма в ответ на антиген. У позвоночных это может включать продукцию антител, индукцию опосредованного клетками иммунитета и/или активацию комплемента (например, феномен, ассоциированный с предупреждением и разрешением инфекции, вызванной микроорганизмами, под действием иммунной системы позвоночного). В предпочтительных вариантах осуществления термин иммунный ответ включает, не ограничиваясь этим, одно или более из следующих терминов "пролиферативный ответ лимфоцитов", "ответ цитокинов" и "ответ антител".

В том смысле, в котором в данном документе используется термин "суммарный заряд" по отношению к пептидной последовательности, он относится к общему электрическому заряду пептидной последовательности, представленному суммой зарядов каждой отдельной аминокислоты в пептидной последовательности, где каждой основной аминокислоте дан заряд +1, каждой кислой аминокислоте дан заряд -1, и каждой нейтральной аминокислоте дан заряд 0. Следовательно, общий заряд будет зависеть от числа и характера заряженных аминокислот.

В том смысле, в котором в данном документе используется термин "основная аминокислота", он относится к любой аминокислоте, включая природные и неприродные аминокислоты, которые имеют изоэлектрическую точку выше 6,3 (например, выше 7,4), что определяется, как описано Kice&Marvell "Modern Principles of Organic Chemistry" (Macmillan, 1974) или Matthews and van Holde "Biochemistry" Cummings Publishing Company, 1996. В данное определение включаются аргинин, лизин, гомоаргинин (Har) и гистидин, а также их производные. Подходящими основными аминокислотами, отличными от природных, являются, например, описанные в патенте США № 6858396. Подходящие положительно заряженные аминокислоты включают альфа-аминокислоты, отличные от природных, производства Bachem AG, и они включают альфа-аминоглицин, альфа-, гамма-диаминомасляную кислоту, орнитин, альфа-, бета-диаминопропионовую кислоту, альфа-диформетилорнитин, 4-аминопиперидин-4-карбоновую кислоту, 2,6-диамино-4-гексеновую кислоту, бета-(1-пиперазинил)аланин, 4,5-дегидролизин, дельта-гидроксилизин, омега-гидроксинораргинин, гомоаргинин, омега-аминоаргинин, омега-метиларгинин, альфа-метилгистидин, 2,5-дигидрогистидин, 1-метилгистидин, 3-метилгистидин, бета-(2-пиридил)аланин, бета-(3-пиридил)аланин, бета-(2-хинолил)аланин, 3-аминотирозин, 4-аминофенилаланин и спинацин.

В том смысле, в котором в данном документе используется термин "нейтральная аминокислота", он относится к аминокислоте, которая имеет изоэлектрическую точку между 4,8 и 6,3, что определяют, как описано Kice&Marvell "Modern Principles of Organic Chemistry" (Macmillan, 1974). В том смысле, в котором в данном документе используется термин "кислая аминокислота", он относится к аминокислоте, ко-

торая имеет изоэлектрическую точку ниже 4,8, что определяется, как описано Kice&Marvell "Modern Principles of Organic Chemistry" (Macmillan, 1974).

Антигены.

Специфический природный антиген, используемый в пептидных конструкциях по настоящему изобретению, может представлять собой белковую или пептидную последовательность, полученную из любого антигена В-клеток, например антигена, вызывающего заболевание, такого как инфекционный агент. Подходящие антигены для использования по настоящему изобретению включают антигены, полученные из бактерий, микобактерий, вируса, паразита, такого как простейшее, грибка, ракового антигена, такого как онкоген, приона, антигена атопического заболевания, вызывающего привыкание или злоупотребление вещества, или токсина, или антигена аутоиммунного заболевания, такого как ревматоидный артрит, инсулинзависимый диабет, рассеянный склероз и тому подобное.

В том смысле, в котором в данном документе используется термин "антиген, вызывающий заболевание", он относится к антигену, о котором имеется подтвержденная или предполагаемая информация, что он участвует в развитии конкретного заболевания.

В некоторых вариантах осуществления антиген представляет вызывающее злоупотребление или привыкание вещество или его фрагмент, включая, не ограничиваясь этим, никотин, наркотик, средство, подавляющее кашель, транквилизатор и седативное средство. В некоторых вариантах осуществления антиген представляет токсин, такой как токсин из химического оружия или природных источников, или загрязнитель.

Примеры бактерий, антигены которых можно обеспечить, включают, не ограничиваясь этим, *M. tuberculosis*, микобактерии, микоплазмы, нейссерии и легионеллы. Примеры паразитов включают, не ограничиваясь этим, риккетсии и хламидии.

Примером антигенов при инфекционных заболеваниях является TbH9 (также известный как Mtb 39A), антиген возбудителя туберкулеза. Другие антигены возбудителя туберкулеза включают, не ограничиваясь этим, DPV (также известный, как Mtb8.4), 381, Mtb41, Mtb40, Mtb32A, Mtb9.9A, Mtb9.8, Mtb10, Mtb72f, Mtb59f, Mtb88f, Mtb71f, Mtb46f и Mtb31f ("f" указывает, что это слитая конструкция из двух или более белков).

Примерами раковых антигенов может быть ассоциированный с опухолями антиген, такой как рецептор HER2, HER3 или HER4, или один или более ассоциированных с опухолями антигенов или рецепторов клеточной поверхности, раскрытых в публикации заявки на патенты США №№ 2008017040 или 20080305044, которые в полном объеме включены в данный документ для сведения.

Другие подходящие раковые антигены, которые можно использовать в настоящем изобретении, включают белки CD, такие как CD2, CD3, CD4, CD5, CD6, CD8, CD11, CD14, CD18, CD19, CD20, CD21, CD22, CD25, CD26, CD27, CD28, CD30, CD33, CD36, CD37, CD38, CD40, CD44, CD52, CD55, CD56, CD70, CD79, CD80, CD81, CD103, CD105, CD134, CD137, CD138 и CD152; члены семейства рецепторов ErbB, такие как рецептор EGF, рецептор HER2, HER3 или HER4; молекулы клеточной адгезии, такие как LFA-I, Mac1, p150.95, VLA-4, ICAM-I, VCAM, EpCAM, альфа4/бета7 интегрин, и альфа v/бета3 интегрин, включая, не ограничиваясь этим, его субъединицы альфа или бета (например, антитела анти-CD11a, анти-CD18 или анти-CD11b); ростовые факторы, такие как VEGF; тканевой фактор (TF); TGF-β; альфа-интерферон (альфа-IFN); интерлейкин, такой как IL-8; IgE; антигены группы крови Apo2, рецептор смерти; рецептор flk2/flt3; рецептор ожирения (OB) ; рецептор mpl; CTLA-4; белок C и т.д. В некотором варианте осуществления антиген выбран из IGF-IR, CanAg, EphA2, MUC1, MUC16, VEGF, TF, CD19, CD20, CD22, CD27, CD33, CD37, CD38, CD40, CD44, CD56, CD138, CA6, Her2/neu, EpCAM, CRIPTO (белок, продуцируемый в повышенных количествах в большинстве клеток рака молочной железы человека), дарпины, альфа v/бета3 интегрин, альфа v/бета5 интегрин, альфа y/бета интегрин, TGF-β, CD11a, CD18, Apo2 и C242. В некотором варианте осуществления антиген выбран из белков CD, таких как CD3, CD4, CD8, CD19, CD20, CD27, CD34, CD37, CD38, CD46, CD56, CD70 и CD138; членов семейства рецепторов ErbB, таких как рецептор EGF, рецептор HER2, HER3 или HER4; молекул клеточной адгезии, таких как LFA-I, Mac1, p150.95, VLA-4, ICAM-I, VCAM, EpCAM, альфа4/бета7 интегрин и альфа v/бета3 интегрин, включая, не ограничиваясь этим, его субъединицы альфа или бета (например, антитела анти-CD11a, анти-CD18 или анти-CD11b); ростовых факторов, таких как VEGF; тканевого фактора (TF); TGF-β; альфа-интерферона (альфа-IFN); интерлейкина, такого как IL-8; IgE; антигенов группы крови Apo2, рецептор смерти; рецептора flk2/flt3; рецептора ожирения (OB) ; рецептора mpl; CTLA-4; белка C и т.д. Наиболее предпочтительными мишенями являются IGF-IR, CanAg, EGF-R, EGF-RvIII, EphA2, MUC1, MUC16, VEGF, TF, CD19, CD20, CD22, CD27, CD33, CD37, CD38, CD40, CD44, CD56, CD70, CD138, CA6, Her2/neu, CRIPTO (белок, продуцируемый в повышенных количествах в большинстве клеток рака молочной железы человека), альфа v/бета3 интегрин, альфа v/бета5 интегрин, TGF-β, CD11a, CD18, Apo2, EpCAM и C242. В некотором варианте осуществления антиген выбран из клеточного онкогена, такого как *ras* или *src*.

Примеры вирусных антигенов для применения по настоящему изобретению включают, не ограничиваясь этим, например, HIV, HCV, CMV, HPV, Flu, аденовирусы, ретровирусы, пикорнавирусы и т.д.

Неограничивающим примером ретровирусных антигенов являются такие ретровирусные антигены из антигенов вируса иммунодефицита человека (HIV), как продукты генов *gag*, *pol* и *env*, белок Nef, обратная транскриптаза и другие компоненты HIV; антигены вирусов гепатита, такие как белки S, M и L вируса гепатита В, пре-S антиген вируса гепатита В, и другого гепатита, например гепатита А, В и С, вирусные компоненты, такие как РНК вируса гепатита С; антигены вируса гриппа, такие как гемагглютинин и нейраминидаза, и другие компоненты вируса гриппа; антигены вируса кори, такие как слитый белок вируса кори и другие компоненты вируса кори; антигены вируса краснухи, такие как белки Е1 и Е2, и другие компоненты вируса краснухи; ротавирусные антигены, такие как VP7sc и другие ротавирусные компоненты; цитомегаловирусные антигены, такие как гликопротеин оболочки В и другие антигенные компоненты цитомегаловирусов; антигены респираторно-синцитиального вируса, такие как слитый белок RSV, белок М2 и другие антигенные компоненты респираторно-синцитиального вируса; антигены вируса простого герпеса, такие как промежуточные ранние белки, гликопротеин D и другие антигенные компоненты вируса простого герпеса; антигены вируса опоясывающего лишая, такие как gpI, gpII и другие антигенные компоненты вируса опоясывающего лишая; антигены вируса клещевого энцефалита, такие как белки Е, М-Е, М-Е-NSI, NSI, NS1-NS2A, 80% Е и другие антигенные компоненты вируса клещевого энцефалита; антигены вируса бешенства, такие как гликопротеин вируса бешенства, нуклеопротеин вируса бешенства и другие антигенные компоненты вируса бешенства. Дополнительные примеры вирусных антигенов см. в *Fundamental Virology, Second Edition*, eds. Fields, B.N. and Knipe D.M. (Raven Press, New York, 1991).

Эпитопы для включения в скэффолд по настоящему изобретению можно получить из вирусов в семействах вирусов, таких как *adenoviridae*, *retroviridae*, *picornaviridae*, *herpesviridae*, ротавирусы (*reoviridae*), хантавирусы (*Bunyaviridae*), *coronaviridae*, *togaviridae*, *flavirviridae*, *rhabdoviridae*, *paramyxoviridae*, *orthomyxoviridae*, *bunyaviridae*, *arenaviridae*, *reoviridae*, *papillomaviridae*, *parvoviridae*, *poxviridae*, *hepadnaviridae* или спонгиформного вируса. В некоторых конкретных неограничивающих примерах вирусный антиген представляет пептиды, полученные по меньшей мере из одного из вирусов HIV, CMV, вируса гепатита А, В и С, гриппа, кори, полиомиелита, оспы, краснухи; респираторно-синцитиального вируса, вируса простого герпеса, вируса опоясывающего лишая, вируса Эпштейна-Барра, вируса клещевого энцефалита, вируса бешенства, гриппа и/или простуды.

Пептиды по настоящему изобретению могут включать известный антиген. В отношении антигенов, полученных из HCV, данные антигены могут быть получены из белка Core, E1, E2, P7, NS2, NS3, NS4 (NS4A и NS4B) и NS5 (NS5A и NS5B) вируса гепатита С (HCV). Эпитопами являются эпитопы, которые индуцируют ответ HLA I класса и/или II класса, ограниченные ответом Т-лимфоцитов, у иммунизированного хозяина. Конкретнее, пептиды, ограниченные I классом, по настоящему изобретению могут связываться по меньшей мере с одной молекулой HLA I класса: HLA*01, HLA-A*02, HLA-A*03, HLA-A*11, HLA-A*24, HLA-B*07, HLA-B*08, HLA-B*35, HLA-B*40, HLA-B*44, HLA-Cw3, HLA-Cw4, HLA-Cw6 или HLA-Cw7. Пептиды, ограниченные II классом, по настоящему изобретению могут связываться по меньшей мере с одной молекулой II класса: HLA-DRB1, -DRB2, -DRB3, -DRB4, -DRB5, -DRB6, -DRB7, -DRB8 или -DRB9.

Связывающиеся с МНС пептиды HCV, которые можно использовать по настоящему изобретению в качестве эпитопов, раскрыты, например, в международных заявках WO 02/34770 (Imperial College Innovations Ltd), WO 01/21189 и WO 02/20035 (Epimmune), WO 04/024182 (Intercell), WO 95/25122 (The Scripps Research Institute), WO 95/27733 (Правительство США, Министерство здравоохранения и социальных служб), EP 0935662 (Chiron), WO 02/26785 (Immunosystems GmbH), WO 95/12677 (Innogenetics N.V.), WO 97/34621 (Cytel Corp.) и EP 1652858 (Innogenetics N.V.).

В других вариантах осуществления скэффолд по настоящему изобретению содержит пептид PADRE, такой как универсальный эпитоп Т-клеток, называемый PADRE, раскрытый в международной заявке WO 95/07707 (Epimmune), которая включена в данный документ для сведения. Связывающий пептид "PanDR или пептид PADRE" является членом семейства молекул, которые связываются с более чем одной молекулой HLA II класса DR. PADRE связывается с большинством молекул HLA-DR и стимулирует ответы Т-лимфоцитов-хелперов человека (HTL) в условиях *in vitro* и *in vivo*. Альтернативно можно использовать эпитопы Т-хелперов из широко используемых вакцин, таких как столбнячный токсин.

В дополнительном варианте осуществления пептиды в композиции или полиэпитопный пептид характеризуются тем, что они получены из белка HCV и конкретнее по меньшей мере из одной из следующих областей HCV, выбранных из группы, состоящей из Core, E1, E2/NS1, NS2, NS3, NS4A, NS4B и NS5B. Еще более предпочтительным является то, что пептиды характеризуются тем, что они находятся в консенсусной последовательности HCV генотипа 1a, 1b и/или 3a.

Другие пептиды, связывающиеся с HLA I и II класса, которые можно использовать по изобретению, можно идентифицировать способом, описанным в WO 03/105058 - Algonomics, способом, который описан Epimmune в WO 01/21189, и/или в трех общедоступных базах данных серверов предсказания соответственно Syfpeithi, BIMAS и nHLAPred. Также аспектом настоящего изобретения является то, что каждый пептид можно использовать в скэффолде по изобретению в комбинации с тем же пептидом как многочисленные повторы или с любым другим пептидом(и) или эпитопом(и).

Цитомегаловирус (CMV).

Эпитопы для включения в скэффолд по настоящему изобретению могут быть получены из цитомегаловируса (CMV), включая гликопротеины gB и gH CMV.

Вирус гриппа (Flu).

Эпитопы для включения в скэффолд по настоящему изобретению могут быть получены из фрагментов или участков гемагглютиниона (HA) или нейраминидазы (NA), нуклеопротеина (NP), M1, M2, NS1, NEP, PA, PB1, PB1-F2, PB2 для каждой из подгрупп, таких как H1N1, H2N2 или H3N2, вируса гриппа.

Подходящие эпитопы могут быть получены из белка HA одного или более субтипов, включая H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15 или H16 или их фрагмент или участок. Примеры субтипов, содержащих такие белки HA, включают A/New Caledonia/20/99 (H1N1), A/Indonesia/5/2006 (H5N1), A/chicken/New York/1995, A/herring gull/DE/677/88 (H2N8), A/Texas/32/2003, A/mallard/MN/33/00, A/duck/Shanghai/1/2000, A/northern pintail/TX/828189/02, A/Turkey/Ontario/6118/68 (H8N4), A/shoveler/Iran/G54/03, A/chicken/Germany/N/1949 (H10N7), A/duck/England/56 (H11N6), A/duck/Alberta/60/76 (H12N5), A/Gull/Maryland/704/77 (H13N6), A/Mallard/Gurjev/263/82, A/duck/Australia/341/83 (H15N8), A/black-headed gull/Sweden/5/99 (H16N3), B/Lee/MN/40, C/Johannesburg/66, A/PuertoRico/8/34 (H1N1), A/Brisbane/59/2007 (H1N1), A/Solomon Islands 3/2006 (H1N1), A/Brisbane 10/2007 (H3N2), A/Wisconsin/67/2005 (H3N2), B/Malaysia/2506/2004, B/Florida/4/2006, A/Singapore/1/57 (H2N2), A/Anhui/1/2005 (H5N2), A/Vietnam/1194/2004 (H5N1), A/Teal/HongKong/W312/97 (H6N1), A/Equine/Prague/56 (H7N7), A/HongKong/1073/99 (H9N2)).

В некоторых вариантах осуществления изобретения белок HA может представлять субтип H1, H2, H3, H5, H6, H7 или H9. В других вариантах осуществления белок H1 может происходить из штамма A/New Caledonia/20/99 (H1N1), A/PuertoRico/8/34 (H1N1), A/Brisbane/59/2007 (H1N1) или A/Solomon Islands 3/2006 (H1N1). Белок H3 может также быть из штамма A/Brisbane 10/2007 (H3N2) или A/Wisconsin/67/2005 (H3N2). В еще одних вариантах осуществления белок H2 может происходить из штамма A/Singapore/1/57 (H2N2). Белок H5 может быть из штамма A/Anhui/1/2005 (H5N1), A/Vietnam/1194/2004 (H5N1) или A/Indonesia/5/2005. В еще одних вариантах осуществления белок H6 может быть из штамма A/Teal/HongKong/W312/97 (H6N1). Белок H7 может происходить из штамма A/Equine/Prague/56 (H7N7). В еще одних вариантах осуществления белок H9 происходит из A/HongKong/1073/99 (H9N2). В еще одних вариантах осуществления белок HA может быть из вируса гриппа, который может быть вирусом типа В, включая B/Malaysia/2506/2004 или B/Florida/4/2006. Белок HA вируса гриппа может представлять H5 Indonesia.

Вирус иммунодефицита человека (ВИЧ).

В отношении ВИЧ эпитопы для включения в скэффолд по настоящему изобретению могут быть получены из вирусных белков, состоящих из регуляторных белков gp120, gp160, gp41, p24gag или p55gag (таких как Tat, Rev, Nef), а также вирусных ферментов (таких как полимеразы, интегразы или протеазы), полученных из ВИЧ, включая членов различных генетических субтипов.

Папилломавирус человека (HPV).

В отношении HPV эпитопы для включения в скэффолд по настоящему изобретению могут быть получены из группы, состоящей из белков E1, E2, E3, E4, E6 и E7, L1 или L2. Эпитопы могут происходить из любого типа, включая типы 8, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 и 59.

Носители, адъюванты и растворители - доставка.

Пептиды по изобретению могут быть доставлены различными способами и в различных композициях, далее по тексту относящиеся к "композициям", "вакцинным композициям" или "фармацевтическим композициям". Пептиды по настоящему изобретению и фармацевтические и вакцинные композиции по изобретению являются пригодными для введения животным, таким как млекопитающие, и в частности, людям, для лечения и/или профилактики вирусной инфекции. Вакцинные композиции, содержащие пептиды по изобретению, вводят пациенту, зараженному данным вирусом, или индивидууму, восприимчивому к нему, или иначе при наличии риска развития вирусной инфекции, для индукции иммунного ответа против специфических антигенов и таким образом усиления способности пациента продуцировать свой собственный иммунный ответ.

Различные известные в данной области системы для доставки можно использовать для доставки пептидов в соответствующие клетки. Пептиды можно доставить в фармацевтически приемлемом носителе или в виде коллоидных суспензий, или порошков, с или без разбавителей. Они могут быть "голыми" или ассоциированными с растворителями для доставки и доставляться с использованием систем доставки, известных в данной области, таких как рекомбинантные вирусные частицы, наночастицы, такие как нанозолото, или циклотиды.

"Фармацевтически приемлемый носитель" или "фармацевтически приемлемый адъювант" представляет собой любой подходящий эксципиент, разбавитель, носитель и/или адъювант, которые сами по себе не индуцируют продукцию антител, представляющих опасность для индивидуума, получающего композицию, но и не вызывают защитного эффекта. Предпочтительно фармацевтически приемлемый носитель или адъювант усиливает иммунный ответ, вызванный антигеном. Как правило, подходящие

носители или адъюванты включают одно или более соединений, входящих в состав следующего неисчерпывающего перечня: крупные, медленно метаболизирующиеся макромолекулы, такие белки, полисахариды, полимолочные кислоты, полигликолевые кислоты, полимерные аминокислоты, сополимеры аминокислот и неактивные вирусные частицы; гидроксид алюминия, фосфат алюминия (см. публикацию международной заявки на патент WO 93/24148), квасцы ($KAl(SO_4)_2 \cdot 12 H_2O$), или одно из них в комбинации с 3-О-деацетилованным монофосфорилилипидом А (см. публикацию международной заявки на патент WO 93/19780); N-ацетилмурамил-L-треонил-D-изоглутамин (см. патент США № 4606918), N-ацетилнормурамил-L-аланил-D-изоглутамин, N-ацетилнормурамил-L-аланил-D-изоглутамин-L-аланин-2-(1',2'-дипальмитоил-sn-глицеро-3-гидроксифосфорилокси)этиламин; RIBI (immunoChem Research Inc., Hamilton, MT, США), который содержит монофосфорилилипид А (т.е. детоксицированный эндотоксин), трегалоза-6,6-димиколят и скелет клеточной стенки (MPL+TDM+CWS) в 2% эмульсии сквален/твин 80. Любой из трех компонентов MPL, TDM или CWS также можно использовать по отдельности или в комбинации 2 и 2; адъюванты, такие как Stimulon (Cambridge Bioscience, Worcester, MA, США), SAF-1 (SynTex); адъюванты, такие как комбинации QS21 и 3-де-О-ацетилованный монофосфорилилипид А (см. международную заявку WO 94/00153), которые можно дополнительно дополнить эмульсией масла-в-воде (см., например, см. международные заявки WO 95/17210, WO 97/01640 и WO 98/56414), где эмульсия масло-в-воде содержит метаболизируемое масло и сапонин, или метаболизируемое масло, сапонин и стерол, или которые можно дополнительно дополнить цитокином (см. международную заявку WO 98/57659); адъюванты, такие как MF-59 (Chiron) или адъюванты на основе поли[ди(карбоксилатофеноксифосфазена)] (Virus Research Institute); адъюванты на основе блок-сополимера, такие как Optivax (Vaxcel, Cytrx), или адъюванты на основе инулина, такие как Algammulin и Gammalnulin (Anutech); полный или неполный адъювант Фрейнда (соответственно CFA или IFA) или препараты Gerbu (Gerbu Biotechnik); сапонин, такой как QuilA, очищенный сапонин, такой как QS21, QS7 или QS17, эсцин или дигитонин; иммуностимулирующие олигонуклеотиды, содержащие неметилированные CpG-динуклеотиды, такие как олигонуклеотиды [пурин-пурин-CG-пиримидин-пиримидин]. Такие иммуностимулирующие олигонуклеотиды включают молекулы CpG класса A, B и C (Coley Pharmaceuticals), ISS (Dynavax), иммуномеры (Hybridon). Иммуностимулирующие олигонуклеотиды также могут быть объединены с катионными пептидами, описанными, например, Riedl et al., (2002); иммунными стимулирующими комплексами, включающими сапонины, например Quil A (ISCOMS); эксципиентами и разбавителями, которые изначально являются нетоксичными и нетерапевтическими, такими как вода, физиологический раствор, глицерин, этанол, изопропиловый спирт, ДМСО, смачивающие и эмульгирующие агенты, pH-забуферивающие вещества, консерванты и тому подобное; биodeградируемым и/или биосовместимым маслом, таким как сквалан, сквален, эйкозан, тетратетракантан, глицерин, арахисовое масло, растительное масло, в концентрации, например, от 1 до 10% или от 2,5 до 5%; витаминами, такими как витамин С (аскорбиновая кислота или ее соли и эфиры), витамин Е (токоферол) или витамин А; каротеноидами или природными или синтетическими флаваноидами; микроэлементами, такими как селен, любыми лигандами Toll-подобного рецептора, как приведено в обзоре Barton and Medzhitov (2002).

Любой из вышеприведенных адъювантов, содержащий 3-де-О-ацетилованный монофосфорилилипид А, где указанный 3-де-О-ацетилованный монофосфорилилипид А, может образовать небольшую частицу (см. международную заявку WO 94/21292).

В любом из вышеуказанных адъювантов MPL или 3-де-О-ацетилованный монофосфорилилипид А можно заменить синтетическим аналогом, относящимся к RC-529, или любым другим аминокислотозаменид-4-фосфатом (Johnson et al., 1999, Persing et al., 2002). Альтернативно он может быть заменен другими аналогами липида А, такими как OM-197 (Byl et al., 2003).

"Фармацевтически приемлемый растворитель" включает такие растворители, как вода, солевой раствор, физиологические солевые растворы, глицерин, этанол и т.д. В такие растворители могут быть включены вспомогательные вещества, такие как смачивающие или эмульгирующие агенты, pH-забуферивающие агенты, консерванты. Системами для доставки, известными в данной области, являются, например, липопептиды, пептидные композиции, инкапсулированные в поли-D,L-лактид-со-гликолид ("PLG"), микросферы, пептидные композиции, находящиеся в иммунных стимулирующих комплексах (ISCOMS), многочисленные антигенные пептидные системы (MAP), вирусные векторы для доставки, частицы вирусного или синтетического происхождения, адъюванты, липосомы, липиды, микрочастицы или микрокапсулы, частицы золота, наночастицы, полимеры, конденсирующие агенты, полисахариды, полиаминокислоты, дендримеры, сапонины, QS21, вещества, усиливающие всасывание, жирные кислоты или "голые" или находящиеся в частицах кДНК.

Пептиды можно доставить в маслах, таких как Endocrine™ и Montanide™ (Eucorine) - Montanide™ ISA 51 VG или Montanide™ ISA 720 VG (Seppic).

Адъювант может представлять собой стимуляторы врожденной иммунной системы, которые можно вводить отдельно от пептида, такие как лейкотриен B4 (LTB4) и колониестимулирующий фактор гранулоцитов и макрофагов (GM-CSF), такой как сарграмостим/лейкин (гликозилированный GM-CSF) и мол-

грамостин (негликозилированный GM-CSF).

Как правило, вакцину или вакцинную композицию готовят в виде инъекционного препарата, в виде жидкого раствора или суспензии. Инъекция может быть подкожной, внутримышечной, внутривенной, внутрибрюшинной, интратекальной, внутрикожной или интраэпидермальной. Другие типы введения включают электропорацию, имплантацию, суппозитории, прием внутрь, кишечное введение, ингаляцию, аэрозольный или назальный спрей или капли. Можно также приготовить твердые формы, подходящие для растворения или суспендирования в жидких растворителях перед инъекцией. Препарат также может быть эмульгирован или инкапсулирован в липосомы для повышения адьювантного эффекта.

Жидкая композиция может включать масла, полимеры, витамины, углеводы, аминокислоты, соли, буферы, альбумин, поверхностно-активные вещества или объемобразующие агенты. Предпочтительные углеводы включают сахар или сахарные спирты, такие как моно-, ди-, три-, олиго- или полисахариды, или водорастворимые глюконы.

Сахариды или глюконы могут включать фруктозу, декстрозу, лактозу, маннозу, сорбозу, ксилозу, мальтозу, сахарозу, декстран, пуллулан, декстрин, альфа- и бета-циклодекстрин, растворимый крахмал, гидроксиметилкрахмал и карбоксиметилцеллюлозу или их смеси. Сахароза является наиболее предпочтительной. "Сахарный спирт" определяется как C4-C8 углеводород, содержащий ОН-группу, и он включает галактитол, инозит, маннит, ксилит, сорбит и арабитол. Маннит является наиболее предпочтительным. Такие вышеуказанные сахара или сахарные спирты можно использовать по отдельности или в комбинации. Отсутствует фиксированный предел в отношении используемого количества при условии, что сахар или сахарный спирт растворим в водном препарате. Предпочтительно концентрация сахара или сахарного спирта находится в пределах от 1,0 до 7,0% (мас./об.), более предпочтительно в пределах от 2,0 до 6,0% (мас./об.). Предпочтительно аминокислоты включают левовращающие формы (L) карнитина, аргинина и бетаина; однако можно добавить другие аминокислоты. Предпочтительные полимеры включают поливинилпирролидон (PVP) со средней молекулярной массой в пределах от 2000 до 3000 или полиэтиленгликоль (ПЭГ) со средней молекулярной массой в пределах от 3000 до 5000. Также предпочтительно использовать буфер в композиции для сведения до минимума изменений pH в растворе до лиофилизации или после восстановления. Можно использовать любой физиологический буфер, но цитратный, фосфатный, сукцинатный и глутаматный буферы или их смеси являются предпочтительными. Наиболее предпочтительным является цитратный буфер. Предпочтительно концентрация находится в пределах от 0,01 до 0,3 моль. Поверхностно-активные вещества, которые можно добавить в композицию, приведены в заявках на Европейские патенты №№ 270799 и 0268110.

Кроме того, полипептиды могут быть модифицированы химически ковалентной конъюгацией с полимером, например, для повышения периода полужизни. Предпочтительные полимеры и способы их присоединения к пептидам приводятся в патентах США №№ 4766106; 4179337; 4495285 и 4609546. Предпочтительными полимерами являются полиоксиэтилированные полиолы и полиэтиленгликоль (ПЭГ). ПЭГ растворим в воде при комнатной температуре и имеет общую формулу $R(O-CH_2-CH_2)_nO-R$, где R может быть атомом водорода или защитной группой, такой как алкил или алканол. Предпочтительно защитная группа имеет 1-8 атомов углерода, более предпочтительно она является метилом. Символ n представляет положительное целое число предпочтительно в пределах от 1 до 1000, более предпочтительно от 2 до 500. ПЭГ имеет предпочтительную среднюю молекулярную массу от 1000 до 40000, более предпочтительно от 2000 до 20000, наиболее предпочтительно от 3000 до 12000. Предпочтительно ПЭГ содержит по меньшей мере одну гидроксигруппу, более предпочтительно концевую гидроксигруппу. Предпочтительно, чтобы эта гидроксигруппа была активированной. Однако понятно, что тип и количество реакционноспособных групп может различаться для получения ковалентно конъюгированного ПЭГ/полипептида по настоящему изобретению.

Водорастворимые полиоксиэтилированные полиолы также являются пригодными в настоящем изобретении. Они включают полиоксиэтилированный сорбит, полиоксиэтилированную глюкозу, полиоксиэтилированный глицерин (POG) и т.д. POG является предпочтительным. Одной причиной является то, что глицериновый скелет полиоксиэтилированного глицерина представляет тот же скелет, встречающийся в природе, например, у животных и людей, в моно-, ди- и триглицеридах. Следовательно, такое разветвление не будет являться чужеродным агентом в организме. POG имеет предпочтительную молекулярную массу в тех же пределах, что и ПЭГ. Структура POG показана Knauf et al., 1988, и обсуждение конъюгатов POG/IL-2 можно найти в патенте США № 4766106.

Другой системой для доставки в целях увеличения периода полужизни является липосома. Пептиды и нуклеиновые кислоты по изобретению также можно вводить в липосомах, которые служат для целенаправленной доставки в определенную ткань, такую как лимфоидная ткань, или избирательно нацеливания на зараженные клетки, а также увеличения периода полураспада композиции пептида и нуклеиновых кислот. Липосомы включают эмульсии, пены, мицеллы, нерастворимые монослои, жидкие кристаллы, фосфолипидные дисперсии, ламеллярные слои и тому подобное. В данных препаратах пептид или нуклеиновые кислоты, предназначенные для доставки, включаются в виде части липосомы, или инкапсулируются, одни или в сочетании с молекулой, которая связывается с рецептором, преобладающим в лимфоидных клетках, такие как моноклональные антитела, которые связываются с антигеном

CD45, или с другими терапевтическими или иммуногенными композициями. Таким образом, липосомы либо наполненные, либо со встроенным требуемым пептидом или нуклеиновыми кислотами по изобретению, можно направить к месту лимфоидных клеток, куда затем липосомы доставляют композиции пептида и нуклеиновых кислот. Липосомы для применения по изобретению получают из обычных образующих везикулы липидов, которые обычно включают нейтральные и отрицательно заряженные фосфолипиды и стерол, такой как холестерин. Обычно при выборе липидов руководствуются такими соображениями как, например, размер липосом, лабильность и стабильность липосом к кислоте в кровяном русле. Существуют различные способы приготовления липосом, описанные, например, Szoka et al., 1980 и в патентах США №№ 4235871, 4501728, 4837028 и 5019369.

Для нацеливания на клетки иммунной системы лиганд, предназначенный для включения в липосому, может включать, например, антитела или их фрагменты, специфические для детерминант клеточной поверхности требуемых клеток иммунной системы. Суспензию липосом, содержащую пептид, можно вводить внутривенно, локально, местно и т.д. в дозе, которая варьирует в зависимости, среди прочего, от способа введения, пептида, который доставляется, и стадии болезни, которая лечится. Например, известно, что липосомы, несущие иммуногенные полипептиды, вызывают CTL-ответы в условиях *in vivo* (Reddy et al., 1992; Collins et al., 1992; Fries et al., 1992; Nabel et al., 1992).

После приготовления жидкой фармацевтической композиции предпочтительно ее лиофилизовать для предупреждения деградации и сохранения стерильности. Специалистам в данной области известны способы лиофилизации жидких композиций. Непосредственно перед использованием композицию можно восстановить стерильным разбавителем (например, раствором Рингера, дистиллированной водой или стерильным физиологическим раствором), который может включать дополнительные ингредиенты. После восстановления композицию предпочтительно вводят субъектам с использованием способов, известных специалистам в данной области.

Применение пептидов для оценки иммунных ответов.

Пептиды по настоящему изобретению можно использовать в качестве диагностических реагентов. Например, пептид по изобретению можно использовать для определения чувствительности конкретного субъекта к схеме лечения, в которой используется пептид или близкие пептиды, и таким образом может помочь в изменении существующего протокола лечения или в определении прогноза для больного субъекта. Кроме того, пептиды также можно использовать для прогноза того, у каких субъектов будет иметь место большой риск развития хронической вирусной инфекции.

Следовательно, настоящее изобретение относится к способу определения прогноза для субъекта, подвергнувшегося воздействию антигена, вызывающего заболевание, такого как инфекционный агент, такой как патоген, включающему стадии определения того, насколько субъект имеет иммунный ответ на один или более пептидов по настоящему изобретению.

В предпочтительном варианте осуществления пептиды, описанные в данном документе, можно использовать в качестве реагентов для оценки иммунного ответа. Иммунный ответ, который оценивается, может быть индуцирован с использованием в качестве иммуногена любого агента, который может приводить к продукции специфических CTL или HTL, которые распознают и связываются с пептидом(и), предназначенным для применения в качестве реагента. Не требуется использовать пептидный реагент в качестве иммуногена. Аналитические системы, которые можно использовать для такого анализа, включают относительно недавние разработки, такие как тетрамеры, окрашивание на внутриклеточные лимфокины и тесты высвобождения интерферона, или тесты ELISPOT.

Например, пептид по изобретению можно использовать в тесте тетрамерного окрашивания для оценки мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC) в присутствии антигенспецифических CTL с последующим воздействием антигена или иммуногена. HLA-тетрамерный комплекс используется для непосредственной визуализации антигенспецифических CTL (см., например, Ogg et al., 1998; Altman et al., 1996) и определения частоты популяции антигенспецифических CTL в образце мононуклеарных клеток периферической крови. Тетрамерный реагент с использованием пептида по изобретению можно получить следующим образом: пептид, который связывается с молекулой HLA, восстанавливается в присутствии соответствующей тяжелой цепи HLA и бета2-микроглобулина с получением трехмолекулярного комплекса. Комплекс является биотинилированным в карбоксиконце тяжелой цепи в месте, которое было ранее введено в белок. Затем индуцируется образование тетрамера добавлением стрептавидина. С помощью меченого флуоресцентной меткой стрептавидина тетрамер можно использовать для окрашивания антигенспецифических клеток. Затем клетки можно идентифицировать, например, проточной цитометрией. Такой анализ можно использовать для диагностических или прогностических целей. Клетки, идентифицированные таким способом, также можно использовать для терапевтических целей. Также в качестве альтернативы тетрамерам можно использовать пентамеры или димеры (Current Protocols in Immunology (2000) unit 17.2 supplement 35).

Пептиды по изобретению также можно использовать в качестве реагентов для оценки вторичных иммунных ответов (см., например, Bertoni et al., 1997 и Perma et al., 1991). Например, образцы PBMC от субъектов с ВИЧ-инфекцией можно анализировать на присутствие антигенспецифических CTL или HTL с использованием специфических пептидов. Пробу крови, содержащую мононуклеарные клетки, можно

оценить культивированием PBMC и стимуляцией клеток пептидом по изобретению. После соответствующего периода культивирования размноженную клеточную популяцию можно анализировать, например, на цитотоксическую активность (CTL) или на активность HTL.

Пептиды также можно использовать в качестве реагентов для оценки эффективности вакцины.

PBMC, полученные от пациента, вакцинированного иммуногеном, можно анализировать с использованием, например, одного из способов, описанных выше. Пациента типировать по HTL, и реагенты - пептидные эпитопы, которые распознают аллельспецифические молекулы, присутствующие у этого пациента, отбирают для анализа. Иммуногенность вакцины определяется по присутствию эпитопспецифических CTL и/или HTL в образце PBMC.

Также пептиды по изобретению можно использовать для получения антител, применяя методы, хорошо известные в данной области (см., например, CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY, Wiley/Green, NY и Antibodies, A Laboratory Manual, Harlow and Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). Такие антитела включают антитела, которые распознают пептид по отношению к молекуле HLA, т.е. антитела, которые связываются с комплексом пептид-MHC.

В некоторых вариантах осуществления первый мономерный пептид и по меньшей мере один второй мономерный пептид связаны через линкер; линкер может включать любой пептидный линкер или пептидный спейсер, такой как глициновый, лизиновый или аргининовый линкер/спейсер, полигистидиновую метку, белок G и белок A, но также возможно использовать бис-малеимидный линкер/спейсер, дисульфидный линкер или полиэтиленгликолевый (ПЭГ) линкер. На практике любой линкер, считающийся пригодным в химии пептидов, также подходит в качестве линкера по настоящему изобретению. Таким образом, изобретение предусматривает применение "простых" линейных пептидов, которые конъюгированы или конденсированы друг с другом, но также комбинации пептидов, где отдельные пептиды, происходящие из природного антигена, связаны через непептидные линкеры. Применение многочисленных типов линкеров также находится в объеме настоящего изобретения, и также частью изобретения является применение, например, линейных пептидов, которые содержат внутрицепочечные дисульфидные связи.

Особенно интересные комбинации пептидов по изобретению приведены во введении к примерам.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один первый и по меньшей мере один второй пептиды в комбинации пептидов содержат N- или C-концевую модификацию, такую как амидирование, ацилирование или ацетилирование.

Поскольку комбинации пептидов предусматриваются для применения в качестве вакцинных агентов или диагностических агентов, то в некоторых вариантах осуществления они связаны с молекулой-носителем, такой как иммуногенный носитель. Таким образом, пептиды в пептидных комбинациях могут быть связаны с другими молекулами в виде рекомбинантных слитых конструкций (например, посредством технологии CLIP) или через химические связи ориентированным (например, с использованием гетеробифункциональных кросслинкеров) или неориентированным путем. Возможно связывание со всеми возможными по изобретению молекулами-носителями, например, такими как дифтерийный токсин, шарики из латекса (которые удобны в диагностических и прогностических вариантах осуществления) и магнитные шарики (также удобны в диагностических и прогностических вариантах осуществления), полилизиновые конструкции.

Иммуногенный носитель соответственно выбирают из белков-носителей, таких как белки, обычно применяемые в данной области (например, дифтерийный или столбнячный токсин, KLH и т.д.), но также возможно использовать более короткие пептиды (эпитопы Т-хелперов), которые индуцируют Т-клеточный иммунитет в более крупных частях популяции. Подробное описание таких эпитопов Т-хелперов можно найти, например, в международной заявке WO 00/20027, которая включена в данный документ для сведения - где обсуждаются все иммунологические носители и "смешанные" (т.е. универсальные) эпитопы Т-хелперов, которые являются пригодными в качестве иммуногенных носителей по настоящему изобретению.

В некоторых вариантах осуществления носитель представляет собой вирусоподобную частицу, например частицу, разделяющую свойства с различными вирионами, но не будучи при этом инфекционной. Такие вирусоподобные частицы можно получить химическим путем (например, Jennings and Bachmann, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol., 2009, 49:303-326 Immunodrugs: Therapeutic VLP-based vaccines for chronic diseases) или использовать методы клонирования для получения слитых белков (например, Peabody et al., J. Mol. Biol., 2008, 380:252-263. Immunogenic display of diverse peptides on virus-like particles of RNA phage MS2). Еще одним примером является "Remune", вакцина против ВИЧ, первоначально разработанная Immune Response Corporation, которая состоит из инактивированного формалином ВИЧ, который облужен для разрушения вирусного генома.

В варианте осуществления нуклеиновая кислота кодирует один или более мономерных пептидов мультимерного пептида, такого как димерный пептид по изобретению, где кодированный первый пептид и кодированный по меньшей мере один второй пептид мультимерного пептида связаны посредством пептидного линкера, включающего пептидный спейсер и/или дисульфидный мостик. Как правило, пептидный линкер/спейсер выбран из группы, состоящей из глицинового, аргининового, лизинового линке-

ра/спейсера или глицинового-лизинового линкера/спейсера, но может быть пригодным любой пептидный линкер, известный в данной области. Таким образом, термин "пептидный линкер" также предназначен для обозначения связывания первого и второго пептидов посредством пептидной связи. Пептидный линкер, который связывает первый и второй пептиды обычными пептидными связями, также может относиться к пептидному спейсеру. Также первый и второй пептиды могут быть связаны посредством пептидного линкера и дисульфидной связи, как это имеет место в том случае, когда присутствует внутрицепочечная дисульфидная связь.

В одном варианте осуществления нуклеиновая кислота по изобретению кодирует комбинацию пептидов, которые связаны (слиянием) с молекулой-носителем, такой как иммуногенный носитель; подходящие носители уже обсуждались выше.

В некоторых вариантах осуществления линкер выбран из группы, состоящей из бис-малеимидного линкера, дисульфидного линкера, полиэтиленгликолевого (ПЭГ) линкера, глицинового линкера/спейсера, лизинового линкера/спейсера и аргининового линкера/спейсера.

В некоторых вариантах осуществления мультимерный пептид, такой как димерный пептид, содержит линкер в свободной аминогруппе N-конца мономерного пептида, который связывает указанный мономерный пептид с другим мономерным пептидом.

В некоторых вариантах осуществления мультимерный пептид, такой как димерный пептид, содержит линкер, в свободной карбоксильной группе C-конца мономерного пептида, который связывает указанный мономерный пептид с другим мономерным пептидом.

По меньшей мере два возможных варианта таких линкеров описаны A.R. Jacobson et al., J. Med. Chem., 1989, 32, 1708-1717 и D. Giannotti et al., Journal of Medicinal Chemistry, 2000, Vol. 43, № 22, раскрытие которых включено в данный документ для сведения.

Альтернативно связь между N-концами пептидов может быть получена взаимодействием с Br-(CH₂)_n-Br.

Длину линкера можно изменять добавлением остатков глицина, например, можно использовать Fmoc-NH-CH₂CH₂-NH-Gly-NH₂.

Примером такого синтеза, где димерный пептид получают конъюгацией через янтарную кислоту, может быть

(H-Gly-Gly-Ala-Lys-Arg-Arg-Val-Val-Gln-Arg-Glu-Lys-Arg-Ala-Gly-Glu-Arg-Glu-Lys-Arg-Ala-NH₂) E(H-Gly-Gly-Ile-Glu-Glu-Glu-Gly-Gly-Arg-Asp-Arg-Asp-Arg-Gly-Gly-Glu-Gln-Asp-Arg-Asp-Arg-NH₂)F (линкер из янтарной кислоты между Gly¹ и Gly¹F).

Данный димер был получен взаимодействием 2 следующих мономеров:

Мономер E.

H-Gly-Gly-Ala-Lys-Arg-Arg-Val-Val-Gln-Arg-Glu-Lys-Arg-Ala-Gly-Glu-Arg-Glu-Lys-Arg-Ala-NH₂ (SEQ ID NO:143).

Мономер F.

H-Gly-Gly-Ile-Glu-Glu-Glu-Gly-Gly-Arg-Asp-Arg-Gly-Gly-Glu-Glu-Asp-Arg-NH₂ (SEQ ID NO:144).

Два мономера подвергают взаимодействию с получением гетеродимера согласно схеме реакций, приведенной ниже; где связь находится между N-концом Gly¹ в цепи E и N-концом Gly¹ в цепи F.

Мономеры E и F синтезированы по отдельности на смоле Sieber Amid. F-мос-группы в N-концевом Gly удаляются, в то время как пептиды по-прежнему остаются на смоле. Пептиды отщепляются от смолы. Полученный защищенный пептид E подвергают взаимодействию с ангидридом янтарной кислоты и затем взаимодействию с защищенным пептидом F. Затем защитные группы удаляют 95% ТФК. Образовавшийся гетеродимер можно отделить от непрореагировавших мономеров обычными методами очистки, известными специалистам в данной области.

Пример синтеза, где димерный пептид получают конъюгацией через диаминопропан, может быть следующим:

(H-Gly-Gly-Ala-Lys-Arg-Arg-Val-Val-Gln-Arg-Glu-Lys-Arg-Ala-Gly-Glu-Arg-Glu-Lys-Arg-Ala-Gly-Gly)G(H-Gly-Gly-Ile-Glu-Glu-Glu-Gly-Gly-Arg-Asp-Arg-Asp-Arg-Gly-Gly-Glu-Glu-Asp-Arg-Asp-Arg-Gly-Gly)H трифторацетат (диаминопропановый линкер между Gly²³ и Gly²³).

Данный димер был получен взаимодействием 2 следующих защищенных мономеров:

Мономер G.

H-Gly-Gly-Ala-Lys-Arg-Arg-Val-Val-Gln-Arg-Glu-Lys-Arg-Ala-Gly-Glu-Arg-Glu-Lys-Arg-Ala-Gly-Gly-COOH (SEQ ID NO:145).

Мономер H.

H-Gly-Gly-Ile-Glu-Glu-Glu-Gly-Gly-Arg-Asp-Arg-Asp-Arg-Gly-Gly-Glu-Glu-Asp-Arg-Asp-Arg-Gly-Gly-COOH (SEQ ID NO:146).

Два мономера G и H подвергают взаимодействию с получением гетеродимера согласно схеме реакций, приведенной ниже; где связь находится между C-концом Gly²³ в цепи G и C-концом Gly²³ в цепи H.

Мономеры G и H синтезированы по отдельности на 2-хлортритиловой смоле. Вос-Gly-OH присоединяют к пептидам на смоле до их отщепления со смолы. Затем полученные пептиды становятся Вос-защищенными, альтернативно их можно ацетилировать до их отщепления со смолы. Полученный защи-

щенный пептид G подвергают взаимодействию с Fmoc-диаминопропаном, с Fmoc снимают защиту и G присоединяют к С-концу защищенного пептида H посредством пептидной связи. Затем защитные группы удаляют 95% ТФК. Образовавшийся гетеродимер можно отделить от непрореагировавших мономеров обычными методами очистки, известными специалистам в данной области.

Способ синтеза Cys-Lys-мостика.

В качестве примера можно привести получение BI400-B трифторацетата:

(H-Gly-Ala-Lys-Arg-Arg-Val-Val-Gly-Gly-Cys(2-оксоэтил)-Gly-Gly-Ala-Lys-Arg-Arg-Val-Val-Gln-Arg-Glu-Lys-Arg-Ala-Gly-Glu-Arg-Glu-Lys-Arg-Ala-NH₂) A (H-Gly-Lys-Gly-Gly-Ile-Glu-Glu-Glu-Gly-Gly-Arg-Asp-Arg-Asp-Arg-Gly-Gly-Glu-Gln-Asp-Arg-Asp-Arg-NH₂) B трифторацетат (тиоэфирная связь между Cys(2-оксоэтил)¹⁰ A и Lys² B).

Данный димер был получен взаимодействием 2 следующих защищенных мономеров:

Мономер A.

H-Gly-Ala-Lys-Arg-Arg-Val-Val-Gly-Gly-Cys-Gly-Gly-Ala-Lys-Arg-Arg-Val-Val-Gln-Arg-Glu-Lys-Arg-Ala-Gly-Glu-Arg-Glu-Lys-Arg-Ala-NH₂ (SEQ ID NO:121).

Мономер B.

H-Gly-Lys(бромацетил)-Gly-Gly-Ile-Glu-Glu-Glu-Gly-Gly-Arg-Asp-Arg-Asp-Arg-Gly-Gly-Glu-Gln-Asp-Arg-Asp-Arg-NH₂ (SEQ ID NO:122).

Или получением 400-Seq B трифторацетата:

(H-Gly-Ala-Lys-Arg-Arg-Val-Val-Gly-Gly-Cys-(2-оксоэтил)-Gly-Gly-Ala-Lys-Arg-Arg-Val-Val-Gln-Arg-Glu-Lys-Arg-Ala-Gly-Glu-Arg-Glu-Lys-Arg-Ala-NH₂) A (H-Gly-Lys-Gly-Gly-Ile-Glu-Glu-Glu-Gly-Gly-Arg-Asp-Arg-Asp-Arg-Gly-Gly-Gln-Asp-Arg-Asp-Arg-NH₂) B трифторацетат (тиоэфирная связь между Cys (2-оксоэтил)¹⁰ A и Lys² B).

Данный димер был получен взаимодействием 2 следующих защищенных мономеров:

Мономер A.

H-Gly-Ala-Lys-Arg-Arg-Val-Val-Gly-Gly-Cys-Gly-Gly-Ala-Lys-Arg-Arg-Val-Val-Gln-Arg-Glu-Lys-Arg-Ala-Gly-Glu-Arg-Glu-Lys-Arg-Ala-NH₂ ((SEQ ID NO:121).

Мономер B.

H-Gly-Lys(бромацетил)-Gly-Gly-Ile-Glu-Glu-Glu-Gly-Gly-Arg-Asp-Arg-Asp-Arg-Gly-Gly-Gln-Asp-Arg-Asp-Arg-NH₂ (SEQ ID NO:147).

Два мономера подвергают взаимодействию с получением гетеродимера согласно схеме реакций, приведенной ниже; где связь находится между боковой цепью Lys 2 (бромацетил) в цепи B и Cys в цепи A.

При нейтральном pH и комнатной температуре бромацетильные группы в забуференных водных растворах являются очень реакционноспособными по отношению к SH-содержащим группам, таким как тиоловая группа в цистеине. Таким образом, если в другой пептидной последовательности присутствует цистеин, то SH будет атаковать бромацетил с образованием внутримолекулярного тиоэфирного мостика. Когда реакционная смесь забуферивается натрийсодержащим буфером, таким как NaHCO₃, то единственный побочным продуктом реакции будет NaBr, представляющий безвредную соль.

Образовавшийся гетеродимер можно отделить от непрореагировавших мономеров обычными методами очистки, известными специалистам в данной области.

Способ синтеза оксимной связи между двумя пептидными последовательностями, внутримолекулярной связи.

В качестве примера можно привести получение 400-Seq B* трифторацетата:

(H-Gly-Ala-Lys-Arg-Arg-Val-Val-Gly-Gly-Dpr(COCHO)-Gly-Gly-Ala-Lys-Arg-Arg-Val-Val-Gln-Arg-Glu-Lys-Arg-Ala-Gly-Glu-Arg-Glu-Lys-Arg-Ala-NH₂) D (H-Gly-Lys(аминооксиацетилованный)--Gly-Gly-Ile-Glu-Glu-Glu-Gly-Gly-Arg-Asp-Arg-Asp-Arg-Gly-Gly-Gln-Asp-Arg-Asp-Arg-NH₂) C трифторацетат (оксим получен между Dpr(COCHO)-⁹D и Lys(аминооксиацетилованным)²C).

Данный димер получают взаимодействием двух следующих мономеров:

Мономер C.

H-Gly-Lys(аминооксиацетилованный)-Gly-Gly-Ile-Glu-Glu-Glu-Gly-Gly-Arg-Asp-Arg-Asp-Arg-Gly-Gln-Asp-Arg-Asp-Arg-NH₂ (SEQ ID NO:148).

Мономер D.

H-Gly-Ala-Lys-Arg-Arg-Val-Val-Gly-Gly-Dpr(ser)-Gly-Gly-Ala-Lys-Arg-Arg-Val-Val-Gln-Arg-Glu-Lys-Arg-Ala-Gly-Glu-Arg-Glu-Lys-Arg-Ala-NH₂ (SEQ ID NO:149).

Два мономера подвергают взаимодействию с получением гетеродимера согласно схеме реакций, приведенной ниже; где связь находится между боковой цепью Lys² (аминооксиацетилованного) в цепи C и окисленным Dpr(Ser) в цепи D.

После удаления Mtt-группы из Lys, при этом пептид по-прежнему присоединен к смоле, синтезировали аминооксиацетилованный (AoA) мономер C сочетанием аминооксиуксусной кислоты с Lys. Затем пептид отщепляли от твердофазной подложки и очищали обычными методами очистки. Мономер D после отщепления от смолы и очистки получали окислением серинилдиаминопропионового остатка (Dpr (Ser)) периодатом с образованием функциональной альдегидной группы. Эквивалентные количества мо-

номера А и В растворяли в ацетонитриле и ацетатном буфере (рН 4). После взаимодействия в течение 16 ч при комнатной температуре продукт С-оксим-Д выделяли обычными способами очистки, известными специалистам в данной области.

Dpr - диаминопропионовая кислота.

Fmoc-Dpr(Boc-Ser(tBu))-ОН Merck 04-12-1186.

Способ синтеза димеров с ПЭГ-линкером.

Мультимерный пептид, такой как димерный пептид, такой как гетеродимерный пептид, можно синтезировать, не ограничиваясь этим, следуя следующему протоколу:

К пептидиловой смоле, содержащей деблокированный остаток Asp или Glu (мономер 1), добавляют HBTU, DIPEA и Trt-амино ПЭГ амин в ДМФА. Смеси давали прореагировать в течение ночи. Смолу отфильтровывают из раствора и промывают с использованием стандартного протокола. Trt-группу удаляли из Trt-ПЭГилированного пептида. Затем мономер 2, содержащий деблокированный остаток Asp или Glu, сочетают с доступной аминогруппой с использованием HBTU и DIPEA. После отщепления требуемый продукт очищают с использованием любого подходящего метода с получением требуемого мультимерного пептида.

В некоторых вариантах осуществления выделенный мономерный пептид содержит внутримолекулярные связи, такие как внутримолекулярные связи Cys-Cys. Очевидно, понятно, что термин "внутримолекулярная связь", используемая взаимозаменяемо с термином "внутрицепочечная связь", представляет собой связь между двумя различными аминокислотами в одной и той же пептидной цепи, которые, однако, необязательно являются смежными друг другу в пептидной последовательности. Следовательно, в некоторых вариантах осуществления выделенный мультимерный пептид по изобретению может содержать внутримолекулярные связи в одном или более мономерных, а также межмолекулярную связь между двумя цепями мультимерного пептида, такого как димер. Такая внутримолекулярная связь может находиться в виде Cys-Cys-связей, образованных остатками цистеина в одной и той же пептидной последовательности. В некоторых вариантах осуществления мономер содержит внутримолекулярную связь, полученную из остатка Lys или другого аминокислотного остатка, такого как Ser, Cys, Asp или Glu, которые образуют связь, такую как тиоэфирная связь или оксимная связь, или через ПЭГ-линкер, с аминокислотным остатком в другой мономерной пептидной последовательности.

Способ синтеза мультимерных пептидов с поли Lys или MAPS.

Поли Lys или MAPS (множественные антигены-пептиды) широко применяются в течение последних 20 лет в качестве белка-носителя для получения сильных иммуногенных ответов. В MAP-системе используется пептидиловое ядро из трех или более радиально разветвленных лизиновых ядер для образования скелета, для которого можно параллельно построить интересующие эпитопные последовательности с использованием обычной твердофазной химии.

MAP-система является промышленно доступным продуктом от нескольких компаний, таких как AnaSpec, Bio-synthesis Inc. и других. Продукт, как предлагается по каталогу, позволяет осуществлять присоединение только двух (идентичных) пептидных последовательностей к полилизиновому ядру. Однако также возможно связать две различные пептидные последовательности с использованием различных защитных групп для функциональных альфа- и эпсилон-аминогрупп лизина в двух различных пептидных последовательностях.

Применение MAP-системы описано в источниках, включающих Wang C.Y. et al., "Long-term high-titer neutralizing activity induced by octameric synthetic HIV antigen", Science, 254, 285-288 (1991). Posnett D. et al., "A novel method for producing anti-peptide antibodies", J. Biol. Chem., 263, 1719-1725 (1988) и Tarn J.P. "Synthetic peptide vaccine design: synthesis and properties of a high-density multiple antigenic peptide system", PNAS USA, 85, 5409-5413 (1988).

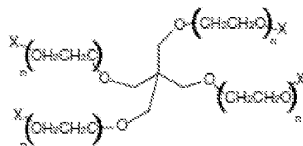
MAP-систему можно приготовить химическим (тиоэфир, оксим, гидразон) связыванием соответствующим образом функционализированных тетра- или октавалентных полилизиновых конструкций с пептидным антигеном. При использовании такого химического лигирования две пептидных последовательности, связанные вместе, не будут идентичными, поскольку они синтезированы по отдельности.

Кроме того, новым применением MAP-основанной системы является синтез на твердой подложке "зонда", содержащего поли(этиленгликолевую) (ПЭГ) цепь в дендритных плечах MAP.

Применение MAP-системы будет приводить к увеличению размера мультимерного комплекса и может усилить иммуногенный ответ.

Способы синтеза мультимерных пептидов с использованием ПЭГ.

Подходящие мультиплечевые активированные ПЭГи для применения в качестве ПЭГ-линкера являются промышленно доступными, например, это соединение следующей структуры:



где X может представлять, среди прочего, этантиол $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SH}$ (можно использовать для образования S-S-мостика с эпитопом или тиоэфирной связи) или пропиламин - $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$. Данные соединения предпочтительно позволяют связать две идентичные пептидные последовательности, и они могут рассматриваться в качестве конструкции, представляющей полимономерный эпитоп. Однако можно связать якорной связью димер (два эпитопа, связанные вместе) ПЭГом, как описано выше.

Способ синтеза конструкции пептид-поли-L-Lys(PLL)-полиэтиленгликоль (ПЭГ).

Конструкции пептид-PLL-ПЭГ можно синтезировать, не ограничиваясь этим, следуя следующему протоколу:

Снимают защиту с Fmoc-поли-L-Lys-смолы (промышленно доступный продукт) смесью 20% пиперидин-ДМФА. Добавляют Fmoc-NH-PEG₄-COOH в смешанном растворителе CH_2Cl_2 -NMP с последующим добавлением HBTU и DIPEA, и реакцию продолжают в течение 24 ч. Полученную пэгилированную поли-L-Lys-смолу промывают, и повторяют стадию пэгилирования. За ходом реакции следят с использованием нингидринового теста Кайзера до получения отрицательного результата. После снятия защиты с Fmoc-группы синтезируют четыре идентичных пептидных цепи непосредственно на разветвленном поли-L-Lys-полиэтиленгликолевом ядре постадийным твердофазным методом. Все остатки, активированные HBTU и DIPEA, сочетают в течение 2 ч. За ходом сочетания следят с использованием нингидринового теста Кайзера и повторяют при необходимости. После отщепления требуемый продукт очищают с использованием любого подходящего метода с получением требуемой пептидной конструкции.

Табл. 1 (подчеркнутые аминокислоты относятся к положению линкера в димерных молекулах; буква С крупным шрифтом относится к остатку цистеина, необязательно принимающему участие в образовании внутримолекулярной связи между другим остатком цистеина в той же пептидной последовательности. Гомоаргинин сокращенно обозначен Har, норлейцин обозначен как Nle или альтернативно одной буквой "Z", N-ε-метилированный Lys обозначен Lys(Me). Цитруллин обозначен одной буквой "B", диаминопропионовая кислота обозначена Drp, и серинилдиаминопропионовая кислота обозначена Drp(Ser). Flu является обозначением гриппа).

Таблица 1

Цепь	Антиген	Номер источника	X1	X2	X3	X4	X5	X6	Положение по отношению к положениям в SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3 и SEQ ID NO:4			
									X2-SEQ	X4-SEQ	X6-SEQ	Белок
	Flu	BI100_CGnat	RR	SLLTEVETP	GCG	VETPIR	G	TPIRNEWG	2-10	7-12	9-16	M2
	Flu	BI100_CG	RR	SLZTDIETP	GCG	IDTPIR	G	TPIBQDWG	2-10	7-12	9-16	M2
	Flu	BI100-CGcyc	WWGC	TDIET	CG	IDTPIR	G	TPIBQDWG	5-9	7-12	9-16	M2
	Flu	BI100-Cyc_2	RRG	CSLLT	C	SLLTEVQTPIRN	GRR	SEWGSRSN	2-5	2-13	13-20	M2
A	Flu	BI150-димер	RRZC	SLLTEVQTPIRN	GRR	VETPIRN			2-13	7-13	-	M2
B	Flu	BI150-димер	WWQC	TPIRSEWGCRSN	GRR	SNDSS	G		9-20	19-23	-	M2
A	Flu	BI150-новый	WW	SLZTDIETP	GCG	IDTPIR	G	TPIBQDWG	2-10	7-12	9-16	M2
B	Flu	BI150-новый	RR(Har)	IDTPIR	G	TPIBQDWG	KG	SLZTDIETPG	7-12	9-16	2-11	M2
A	Flu	BI150-2mod	R	SLZTDIETP	Drp	IDTPIR	G	TPIBQDWG	2-10	7-12	9-16	M2
B	Flu	BI150-2mod	RR	IDTPIR	GG	TPI(Har)QEW	Drp(Ser)	SLZTDIETPG	7-12	9-15	2-11	M2
A	Flu	BI 150-dim_2	RR	SLZTDIETP	GCG	IDTPIR	G	TPIBQDWG	2-10	7-12	9-16	M2
B	Flu	BI 150-dim_2	Har	IDTPIR	G	TPIBQDWG	KG	SLZTDIETPG	7-12	9-16	2-11	M2
	HIV	BI450-AdjBT1	W _h WGC	AKRRV	CGG	AKRRVVQREKRA			501-505	501-512	-	gp120
	HIV	BI450-AdjBT2	W _h WGC	IEEEG	CGG	IEEEGGERDR			222-226	222-231	-	gp41
	HIV		CGG	AKRRVV	GG	AKRRVV	G	QREKRAV	501-506	501-506	507-513	
	HIV		CGGG	DQQLL	GG	AEEEIV	GG	IEEEGGERDRDR	257-261	266-271	221-232	
	HIV		CGG	AKRRVV	GG	AKRRVV	GG	QREKR	501-506	501-506	507-511	
	HIV		CGGG	DQQLL	GG	AEEEIV	GG	IEEEGG	257-261	266-271	222-227	
	HIV		CGG	AEEEVV	GG	DQQLL			266-271	257-261	-	
	HIV		GCGG	AKRRVV	GG	AKRRVV			501-506	501-506	-	
A	HIV	BI400-B (a-цель)	G	AKRRVV	GGCGG	AKRRVVQREKRA	G	EREKRA	501-506	501-512	507-512	gp120
B	HIV	BI400-B (b-цель)	GKG	GIEEE	GG	RDRDR	GG	EQDRDR	221-225	229-233	228-233	gp41

E	HIV		GG	AKRRVVQREKRA	G	EREKRA			501-512	507-512		gp120
F	HIV		G	GIEEE	GG	RDRDR	GG	EQDRDR	221-225	229-233	228-233	gp41
G	HIV		GG	AKRRVVQREKRA	G	EREKRA	GG		501-512	507-512		gp120
H	HIV		G	GIEEE	GG	RDRDR	GG	EQDRDRGG	221-225	229-233	228-235	gp41
A	HIV	400-Seq B (a-цeнb)	G	AKRRVV	GGCGG	AKRRVVQREKRA	G	EREKRA	501-506	501-512	507-512	gp120
B	HIV	400-Seq B (b-цeнb)	GKG	GIEEE	GG	RDRDR	GG	QDRDR	221-225	229-233	229-233	gp41
D	HIV	400-Seq B* (a-цeнb)	G	AKRRVV	GG(Dpr(Ser))G	AKRRVVQREKRA	G	EREKRA	501-506	501-512	507-512	gp120
C	HIV	400-Seq B* (b-цeнb)	GKG	GIEEE	GG	RDRDR	GG	QDRDR	221-225	229-233	229-233	gp41
A	HIV	BI400-Bu1 (a-цeнb)	G	AKRRVV	GGCGG	AKRRVVQREKRA	G	EREKRA	501-506	501-512	507-512	gp120
B	HIV	BI400-Bu1 (b-цeнb)	GKG	GIEEE	GG	ERDRDR	GG	QDRDR	221-225	228-233	229-233	gp41
A	HIV	BI400-Bu2 (a-цeнb)	G	AKRRVV	GGCGG	AKRRVVEREKRA	G	QREKRA	501-506	501-512	507-512	gp120
B	HIV	BI400-Bu2 (b-цeнb)	GKG	GIEEE	GG	QDRDR	GG	RDRDR	221-225	229-233	229-233	gp41
A	HIV	BI400-Bu3 (a-цeнb)	G	AKRRVV	GGCGG	AKRRVVEREKRA	G	QREKRA	501-506	501-512	507-512	gp120
B	HIV	BI400-Bu3 (b-цeнb)	GKG	GIEEE	GG	EQDRDR	GG	ERDRD	221-225	228-233	228-232	gp41
A	HIV	SEQ400_B (Cyc)	GC	AKRRVV	CGGKG	AKRRVVQREKRA	G	EREKRA	501-506	501-512	507-512	gp120
B	HIV	SEQ400_B (Cyc)	GKG	GIEEE	GG	RDRDR	GG	EQDRDR	221-225	229-233	228-233	gp41
A	HIV	SEQ400_B (Cyc)	GC	AKRRVV	CGGKG	AKRRVVQREKRA	G	EREKRA	501-506	501-512	506-512	gp120
B	HIV	SEQ400_B (Cyc)	GCGG	IEEEGGRDRDR	GG	QDRDR			222-233	229-233		gp41
A	HIV	BI400-bu1 (Cyc)	G	CAKRRVVC	GGKG	AKRRVVQREKRA	G	EREKRA	501-506	501-512	507-512	gp120
B	HIV	BI400-bu1 (Cyc)	CGG	IEEEGGERDRDR	GG	QDRDR			222-233	229-233		gp41
A	HIV	BI400-bu2 (Cyc)	G	CAKRRVVC	GGKG	AKRRVVEREKRA	G	QREKRA	501-506	501-512	507-512	gp120
B	HIV	BI400-bu2 (Cyc)	CGG	IEEEGGQDRDR	GG	RDRDR			222-233	229-233		gp41
A	HIV	BI400-bu3 (Cyc)	G	CAKRRVVC	GGKG	AKRRVVEREKRA	G	QREKRA	501-506	501-512	507-512	gp120
B	HIV	BI400-bu3 (Cyc)	CGG	IEEEGGQDRDR	GG	RDRDR			222-233	229-233		gp41
A	HIV	BI400-rev (Cyc)	G	CAKRRVVC	GGKG	AKRRVVQREKRA	G	EREKRA	501-506	501-512	507-512	gp120
B	HIV	BI400-rev (Cyc)	CGG	EEEIGGRDRD	GG	RDRDQ			222-233	229-233		gp41
A	HIV	BI450-1 (a-цeнb)	GG	RLEPWKH	GC	GSQPKTA	G	HPGSQ	7-13	15-21	13-17	Tat
B	HIV	BI450-1 (b-цeнb)	GG	FHSQV	C	FITKGLGISYGRK			32-36	38-50	-	Tat
A	HIV	BI450-1_2 (a-цeнb)		RLEPWKH	GC	GSQPKTA	GWK	HPGSQ	7-13	15-21	13-17	Tat
B	HIV	BI450-1_2 (b-цeнb)	C	FITKGLGISY	G	FITKGLGISYGRK			38-47	38-50		Tat
A	HCV	BI 350-1 (a-цeнb)	RR	LLADARVCS	GG	LLADARVSA			342-350	342-350		E2
B	HCV	BI350-1 (b-цeнb)	R	GV(Nle)AGIAYFS	C	GVLAGIAYYS			163-172	163-172		E1
A	HCV	BI 350-1mod1	RR	GNWAKVL	K	NWAKVI			366-372	367-372	-	E1
B	HCV	BI350-1mod1	RRG	LLADARV	GCG	SGADRV	CS		342-348	342-348	-	E2
A	HCV	BI 350-1mod2	RR	GNWAKVL	Dpr G(Dpr(Ser))G	NWAKVI			366-372	367-372	-	E1
B	HCV	BI350-1mod2	RRG	LLADARV	SGADRV	CS			342-348	342-348	-	E2
A	HCV		RR	GNWAKVL	Lys(Me)	NWAKVI			366-372	367-372	-	E1
B	HCV		RRG	LLADARV	GEG	SGADRV	CS		342-348	342-348	-	E2
A	HCV		RR	GNWAKVL	Lys(Me)	NWAKVI			366-372	367-372	-	E1
B	HCV		RRG	LLADARV	GDG	SGADRV	CS		342-348	342-348	-	E2
A	HCV		RR	GNWAKVL	E G(Lys(Me))G	NWAKVI			366-372	367-372	-	E1
B	HCV		RRG	LLADARV	SGADRV	CS			342-348	342-348	-	E2
A	HCV		RR	GNWAKVL	D G(Lys(Me))G	NWAKVI			366-372	367-372	-	E1
B	HCV		RRG	LLADARV	SGADRV	CS			342-348	342-348	-	E2

Конкретные варианты осуществления изобретения.

В некоторых вариантах осуществления в пептиде по настоящему изобретению X^1 , X^3 и необязательная группа X^5 каждая независимо определяет линейную последовательность из любых 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот.

В некоторых вариантах в пептиде по настоящему изобретению X^1 , X^3 и необязательная группа X^5 состоят из одной или более аминокислот, выбранных из глицина, аргинина, норлейцина, глутамина, серина, лизина, триптофана, цистеина или их производного. Производное может представлять производное любой из указанных аминокислот.

В некоторых вариантах осуществления в пептиде по настоящему изобретению X^1 , X^3 и необязательная группа X^5 состоят из одной или более аминокислот, выбранных из глицина, аргинина, норлейцина, аспарагиновой кислоты, глутаминовой кислоты, глутамина, серина, лизина, триптофана, цистеина, орнитина, диаминопропионовой кислоты (Dpr) или их производного. Производное может представлять производное любой из указанных аминокислот.

В некоторых вариантах осуществления в пептиде по настоящему изобретению X^5 и/или группа X^6 отсутствуют.

В некоторых вариантах осуществления в пептиде по настоящему изобретению X^2 , и/или X^4 , и/или X^6 обладают более чем 55%, например более чем 60%, например более чем 65%, например более чем 70%, например более чем 75%, например более чем 80%, например более чем 85%, например более чем 90%, например более чем 95%, например более чем 96%, например более чем 97%, например более чем 98%, например более чем 99%, например 100% идентичностью последовательности со специфическим природным антигеном.

В некоторых вариантах осуществления в пептиде по настоящему изобретению специфический природный антиген представляет белковую или пептидную последовательность, полученную из антигена, вызывающего заболевание, такого как инфекционный агент, такой как бактериальный, вирусный, паразитарный, грибковый или раковый антигены, такой как онкоген (при раке легких, желудка, молочной железы), или антигена, вызывающего аутоиммунное заболевание, такое как диабет, рассеянный склероз (MS), целиакия, миалгический энцефаломиелит (ME), псориаз и/или болезнь Крона.

Следовательно, подтвержденные или предполагаемые аутоиммунные заболевания, при которых можно получить релевантные антигены, включают аутоиммунный активный хронический гепатит с ахлоргидрией, острый диссеминированный энцефаломиелит, острый геморрагический лейкоэнцефалит, болезнь Аддисона, агаммаглобулинемию, очаговую алопецию, амиотрофический боковой склероз, анкилозирующий спондилит, анти-GMB/TMB нефрит, антифосфолипидный синдром, антисинтетазный синдром, артрит, атопическую аллергию, атопический дерматит, аутоиммунную апластическую анемию, аутоиммунную кардиомиопатию, аутоиммунную гемолитическую анемию, аутоиммунный гепатит, аутоиммунное заболевание внутреннего уха, аутоиммунный лимфопролиферативный синдром, аутоиммунную периферическую нейропатию, аутоиммунный панкреатит, аутоиммунный полиэндокринный синдром типов I, II и III, аутоиммунный прогестероновый дерматит, аутоиммунную тромбоцитопеническую пурпуру, аутоиммунный увеит, болезнь Бало/концентрический склероз Бало, синдром Бехчета, болезнь Бергера, энцефалит Бикерстафа, синдром Блау, буллезный пемфигоид, болезнь Кастлемана, болезнь Чагаса, синдром хронической усталости при иммунной дисфункции, хроническую воспалительную демиелинизирующую полинейропатию, хронический рецидивирующий мультифокальный остеомиелит, хроническую болезнь Лима, хроническую обструктивную болезнь легких, синдром Хурга-Штраусса, рубцовой пемфигоид, целиакию, синдром Когана, болезнь холодовых агглютининов, недостаточность компонента 2 комплемента, краниальный артериит, CREST-синдром, болезнь Крона (один из двух типов идиопатического воспалительного заболевания кишечника "IBD"), синдром Кушинга, кожный лейкоцитокластический ангиит, болезнь Дего, болезнь Деркума, герпетический дерматит, дерматомиозит, сахарный диабет типа 1, диффузный кожный системный склероз, синдром Дресслера, дискоидную красную волчанку, экзему, эндометриоз, артрит, связанный с энтезитом, эозинофильный фасциит, врожденный буллезный эпидермолиз, узловатую эритему, эссенциальную смешанную криоглобулинемию, синдром Эванса, прогрессирующую оссифицирующую фибродисплазию, фибромиалгию, фибромиозит, фиброзный авеолит, гастрит, желудочно-кишечный пемфигоид, гигантоклеточный артериит, гломерулонефрит, синдром Гудпасчера, болезнь Граве, синдром Гуллиана-Барре (GBS), энцефалит Хашимото, тиреоидит Хашимото, гемолитическую анемию, пурпуру Геноха-Шенлейна, гестационный герпес, гнойный гидраденит, синдром Хьюза (см. антифосфолипидный синдром), гипогаммаглобулинемию, идиопатические воспалительные демиелинизирующие заболевания, идиопатическую тромбоцитопеническую пурпуру (см. аутоиммунную тромбоцитопеническую пурпуру), IgA-нефропатию (также болезнь Бергера), миозит с включением телец, воспалительную демиелинизирующую полинейропатию, интерстициальный цистит, синдром раздраженного кишечника (IBS), ювенильный идиопатический артрит, ювенильный ревматоидный артрит, болезнь Кавасаки, миастенический синдром Ламберта-Итона, лейкоцитокластический васкулит, лишай Вильсона, склероатрофический лишай, линейную болезнь IgA (LAD), болезнь Лу Герига (также амиотрофический боковой склероз), липоидный гепатит, красную волчанку, синдром Меджида, синдром Меньера, микроскопический полиангиит, синдром Миллера-Фишера, смешанное со-

единительнотканное заболевание, склеродемию, болезнь Муха-Хабермана, синдром Мукле-Велса, множественную миелому, рассеянный склероз, миастению гравис, миозит, нарколепсию, нейромиелит зрительного нерва (также болезнь Девика), нейромиеотонию, глазной рубцующийся пемфигоид, опсоклонус-миоклонус синдром, тиреоидит Орда, палиндромический ревматизм, PANDAS (педиатрические нейропсихиатрические расстройства, ассоциированные со стрептококком), паранеопластическую церебеллярную дегенерацию, пароксизмальную ночную гемоглобинурию (PNH), синдром Пари-Ромберга, синдром Парсоннаге-Тернера, парспланит, пемфигус, вульгарную пузырчатку, пернициозную анемию, перивентрикулярный энцефаломиелит, синдром ROEMS, нодозный полиартериит, ревматическую полимиалгию, полимиозит, первичный билиарный цирроз, первичный склерозирующий холангит, прогрессирующую воспалительную нейропатию, псориаз, псориазический артрит, гангренозную пиодермию, чистую красноклеточную аплазию, энцефалит Расмуссена, синдром Рейно, рецидивирующий полихондрит, синдром Рейтера, синдром беспокойных ног, ретроперитонеальный фиброз, ревматоидный фиброз, ревматоидную лихорадку, саркоидоз, шизофрению, синдром Шмидта, синдром Шницлера, склерит, склеродерму, синдром Шегрена, спондилоартропатию, синдром внутрисосудистого свертывания крови, болезнь Стилла, синдром ригидного человека, подострый бактериальный эндокардит (SBE), синдром Сусака, сладкий синдром, хорею Сиденхема, симпатическую офтальмию, артериит Такаяси, темпоральный артериит (также известный как "гигантоклеточный артериит"), синдром Толоса-Ханта, трансверсивный миелит, язвенный колит (один из двух типов идиопатической воспалительной болезни кишечника "IBD"), недифференцированную соединительнотканную болезнь, недифференцированную спондилоартропатию, васкулит, витилиго, гранулематоз Вегенера, синдром Вильсона и синдром Вискотта-Олдрича.

В некоторых вариантах осуществления в пептиде по настоящему изобретению специфический природный антиген представляет собой вирусный белок, такой как структурный белок, такой как капсидный белок, регуляторный белок, ферментативный белок и протеолитический белок.

В некоторых вариантах осуществления в пептиде по настоящему изобретению вирусный белок представляет собой белок, такой как структурный белок, такой как белок ядра или оболочки, вируса, выбранного из вируса гепатита С; вируса гриппа, такой как белок M2, вируса иммунодефицита человека (ВИЧ), цитомегаловируса (CMV) и папилломавируса человека (HPV).

В некоторых вариантах осуществления в пептиде по настоящему изобретению вирусный белок представляет собой вирусный белок вируса гепатита С, выбранный из любой одной консенсусной последовательности HCV конкретного генотипа, такого как генотип 1, например субтипы 1a и 1b, генотип 2, например субтипы 2a и 2b, генотип 3, например субтипы 3a и 3b, генотип 4, генотип 5 и генотип 6.

В некоторых вариантах осуществления в пептиде по настоящему изобретению последовательность аминокислот, определяемая $X^1-X^2-X^3-X^4-X^5-X^6$, отсутствует в нативной последовательности указанного природного антигена.

В некоторых вариантах осуществления в пептиде по настоящему изобретению последовательность аминокислот, определяемая $X^1-X^2-X^3-X^4$, отсутствует в нативной последовательности указанного природного антигена.

В некоторых вариантах осуществления в пептиде по настоящему изобретению последовательность аминокислот, определяемая $X^1-X^2-X^3$, отсутствует в нативной последовательности указанного природного антигена.

В некоторых вариантах осуществления в пептиде по настоящему изобретению мономерный пептид состоит из 18-60 аминокислот, например из 19-60 аминокислот, например из 20-60 аминокислот, например из 21-60 аминокислот, например из 22-60 аминокислот, например из 23-60 аминокислот, например из 24-60 аминокислот, например из 25-60 аминокислот, например из 26-60 аминокислот, например из 27-60 аминокислот, например из 28-60 аминокислот, например из 29-60 аминокислот, например из 30-60 аминокислот, например из 31-60 аминокислот, например из 32-60 аминокислот, например из 33-60 аминокислот, например из 34-60 аминокислот, например из 35-60 аминокислот, например из 36-60 аминокислот, например из 37-60 аминокислот, например из 38-60 аминокислот, например из 39-60 аминокислот, например из 40-60 аминокислот, например из 42-60 аминокислот, например из 44-60 аминокислот, например из 46-60 аминокислот, например из 48-60 аминокислот, например из 50-60 аминокислот, например из 52-60 аминокислот, например из 54-60 аминокислот, например из 56-60 аминокислот, например из 58-60 аминокислот.

В некоторых вариантах осуществления в пептиде по настоящему изобретению мономерный пептид состоит из 18-60 аминокислот, например 18-58 аминокислот, например 18-56 аминокислот, например 18-54 аминокислот, например 18-52 аминокислот, например 18-50 аминокислот, например 18-48 аминокислот, например 18-46 аминокислот, например 18-44 аминокислот, например 18-42 аминокислот, например 18-40 аминокислот, например 18-39 аминокислот, например 18-38 аминокислот, например 18-37 аминокислот, например 18-36 аминокислот, например 18-35 аминокислот, например 19-34 аминокислот, например 18-33 аминокислот, например 18-32 аминокислот, например 18-31 аминокислоты, например 18-29 аминокислот, например 18-28 аминокислот, например 18-27 аминокислот, например 18-26 аминокислот, например 18-25 аминокислот, например 18-24 аминокислот, например 18-23 аминокислот, например 18-22 аминокислот, например 18-21 аминокислоты, например 18-20 аминокислот, например 18-19 ами-

нокислот.

В некоторых вариантах осуществления в пептиде по настоящему изобретению мономерный пептид состоит не более чем примерно из 55 аминокислот, например не более чем примерно 50 аминокислот, например не более чем примерно 45 аминокислот, например не более чем примерно 40 аминокислот, например не более чем примерно 38 аминокислот, например не более чем примерно 36 аминокислот, например не более чем примерно 34 аминокислот, например не более чем примерно 32 аминокислот, например не более чем примерно 30 аминокислот, например не более чем примерно 28 аминокислот, например не более чем примерно 26 аминокислот, например не более чем примерно 24 аминокислот, например не более чем примерно 22 аминокислот, например не более чем примерно 20 аминокислот, например не более чем примерно 18 аминокислот, например не более чем примерно 16 аминокислот, например не более чем примерно 14 аминокислот, например не более чем примерно 12 аминокислот, например не более чем примерно 10 аминокислот.

В некоторых вариантах осуществления в пептиде по настоящему изобретению мономерный пептид состоит по меньшей мере примерно из 10 аминокислот, например по меньшей мере примерно 12 аминокислот, например по меньшей мере примерно 14 аминокислот, например по меньшей мере примерно 16 аминокислот, например по меньшей мере примерно 18 аминокислот, например по меньшей мере примерно 20 аминокислот, например по меньшей мере примерно 22 аминокислот, например по меньшей мере примерно 24 аминокислот, например по меньшей мере примерно 26 аминокислот, например по меньшей мере примерно 28 аминокислот, например по меньшей мере примерно 30 аминокислот, например по меньшей мере примерно 32 аминокислот, например по меньшей мере примерно 34 аминокислот, например по меньшей мере примерно 36 аминокислот, например по меньшей мере примерно 38 аминокислот, например по меньшей мере примерно 40 аминокислот, например по меньшей мере примерно 45 аминокислот, например по меньшей мере примерно 50 аминокислот, например по меньшей мере примерно 55 аминокислот, например по меньшей мере примерно 60 аминокислот.

В некоторых вариантах осуществления в пептиде по настоящему изобретению X^2 , X^4 и необязательная группа X^6 каждая независимо определяет линейную последовательность из 5-12 аминокислот, например 5-10 аминокислот, например 5-8 аминокислот.

В некоторых вариантах осуществления в пептиде по настоящему изобретению X^1 , X^3 и необязательная группа X^5 каждая независимо определяет линейную последовательность из любых 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот, независимо выбранных из глицина, аргинина, триптофана и цистеина или их производных. В некоторых вариантах осуществления в пептиде по настоящему изобретению общий суммарный заряд X^1 - X^2 - X^3 - X^4 - X^5 - X^6 равен или выше 0, например выше 1, 2, 3, 4 или 5.

В некоторых вариантах осуществления в пептиде по настоящему изобретению X^1 , X^3 и необязательная группа X^5 независимо определяют линейную последовательность из 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот, независимо выбранных из глицина, аргинина, норлейцина, аспарагиновой кислоты, глутаминовой кислоты, глутамина, серина, лизина, триптофана, цистеина, орнитина, диаминопропионовой кислоты (Dpr) и их производных. В некоторых вариантах осуществления в пептиде по настоящему изобретению общий суммарный заряд X^1 - X^2 - X^3 - X^4 - X^5 - X^6 равен или выше 0, например выше 1, 2, 3, 4 или 5.

В некоторых вариантах осуществления в пептиде по настоящему изобретению X^1 , X^3 и необязательная группа X^5 независимо определяют линейную последовательность из 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот, независимо выбранных из глицина, аргинина, триптофана и цистеина и их производных. В некоторых вариантах осуществления в пептиде по настоящему изобретению общий суммарный заряд X^1 - X^2 - X^3 - X^4 - X^5 - X^6 равен или выше 0, например выше 1, 2, 3, 4 или 5.

В некоторых вариантах осуществления в пептиде по настоящему изобретению общий суммарный заряд любой последовательности, выбранной из X^1 , X^2 , X^3 , X^4 , X^5 и X^6 , равен или выше 0, например выше 1, 2, 3, 4 или 5.

Очевидно, понятно, что фрагменты мономерного пептида, такие как любая последовательность, выбранная из X^1 , X^2 , X^3 , X^4 , X^5 и X^6 , такая как X^3 или X^5 , может иметь общий суммарный заряд ниже 0, если другие фрагменты мономерного пептида, такие как любая другая последовательность, выбранная из X^1 , X^2 , X^3 , X^4 , X^5 и X^6 , имеет общий суммарный заряд выше 0.

Важно, что фрагменты мономерного пептида способны присоединяться к клеточной поверхности, такой как хелперная клетка, связывание с которой облегчается при наличии положительного суммарного заряда последовательности в месте связывания с клеточной мембраной.

В некоторых вариантах осуществления в пептиде по настоящему изобретению мономерный пептид способен индуцировать гуморальный иммунный ответ.

В некоторых вариантах осуществления в пептиде по настоящему изобретению последовательность X^1 , и/или X^3 , и/или X^5 выбрана из K, Lys(Me), RRG, G(Dpr(ser))G, Dpr, Dpr(Ser), GG(Dpr (Ser))GG (SEQ ID NO:150), GEG, CS, GDG, E, G(Lys(Me))G, D, RR, WWGC (SEQ ID NO:54), RRG, RRZC (SEQ ID NO:55), WWQC (SEQ ID NO:56), WW, RR-Har, Har, WDWGC (SEQ ID NO:57), CGG, CGGG (SEQ ID NO:58), GCGG (SEQ ID NO:59), G, GKG, GC, GG, C, R, GCG, GRR, GCGG (SEQ ID NO:60), CGGKG (SEQ ID NO:61), CGGKGG (SEQ ID NO:62), GGKGG (SEQ ID NO:63), KG и GWK.

В некоторых вариантах осуществления в пептиде по настоящему изобретению последовательность

X^2 , и/или X^4 , и/или X^6 выбрана из SLLTEVETP (SEQ ID NO:64), SLZTDIETP (SEQ ID NO:65), TDIET (SEQ ID NO:66), CSLLT (SEQ ID NO:67), SLLTEVQTPIRN (SEQ ID NO:68), TPIRSEWGCRSN (SEQ ID NO:69), IDTPIR (SEQ ID NO:70), AKRRV (SEQ ID NO:71), IEEEG (SEQ ID NO:72), AKRRVV (SEQ ID NO:73), DQQLL (SEQ ID NO:74), AEEEVV (SEQ ID NO:75), GIEEE (SEQ ID NO:76), IEEEGGRDRDR (SEQ ID NO:77), CAKRRVVC (SEQ ID NO:78), IEEEGGERDRDR (SEQ ID NO:79), IEEEGGQDRDR (SEQ ID NO:80), IEEEGGEQDRDR (SEQ ID NO:81), EEEGGRDRD (SEQ ID NO:82), RLEPWKH (SEQ ID NO:83), FHSQV (SEQ ID NO:84), FITKGLGISY (SEQ ID NO:85), LLADARVCS (SEQ ID NO:86), GV(Nle)AGIAYFS (SEQ ID NO:87), VETPIR (SEQ ID NO:88), VETPIRN (SEQ ID NO:89), SNDSS (SEQ ID NO:90), TPIBQDWG (SEQ ID NO:91), AKRRVVQREKRA (SEQ ID NO:92), IEEEGGERDR (SEQ ID NO:93), AEEEEIV (SEQ ID NO:94), RDRDR (SEQ ID NO:95), ERDRDR (SEQ ID NO:96), AKRRV-VEREKRA (SEQ ID NO:97), QDRDR (SEQ ID NO:98), EQDRDR (SEQ ID NO:99), RDRDQ (SEQ ID NO:100), GSQPKTA (SEQ ID NO:101), FITKGLGISYGRK (SEQ ID NO:102), LLADARVSA (SEQ ID NO:103), GVLAGIAYYS (SEQ ID NO:104), TPIRNEWG (SEQ ID NO:105), SEWGSRSN (SEQ ID NO:106), SLZTDIETPG (SEQ ID NO:107), QREKRAV (SEQ ID NO:108), QREKR (SEQ ID NO:109), IEEEGG (SEQ ID NO:110), EREKR (SEQ ID NO:111), QREKRA (SEQ ID NO:112), ERDRD (SEQ ID NO:113), HPGSQ (SEQ ID NO:114), TPIXQEW (SEQ ID NO:151), EQDRDRGG (SEQ ID NO:152), GNWAKVL (SEQ ID NO:153), LLADARV (SEQ ID NO:154), NWAKVI (SEQ ID NO:155) и SGADRV (SEQ ID NO:156).

В некоторых вариантах осуществления в пептиде по настоящему изобретению мономерный пептид содержит по меньшей мере одну, две, три, четыре или пять аминокислот, выбранных из остатка Cys, Lys, Ser, Asp и Glu или их производных.

В некоторых вариантах осуществления в пептиде по настоящему изобретению мономерный пептид содержит по меньшей мере один цистеин, например один, два, три, четыре или пять цистеинов.

Некоторые цистеины могут принимать участие в образовании внутримолекулярных Cys-Cys-связей, в то время как другие могут участвовать в связывании другого пептидного мономера, т.е. в образовании межмолекулярной связи.

В некоторых вариантах осуществления в пептиде по настоящему изобретению последовательность X^1 , и/или X^3 , и/или X^5 определена в табл. 1.

В некоторых вариантах осуществления в пептиде по настоящему изобретению последовательность X^2 , и/или X^4 , и/или X^6 определена в табл. 1.

В некоторых вариантах осуществления структура X^1 - X^2 - X^3 - X^4 - X^5 - X^6 определена в табл. 1.

В некоторых вариантах осуществления мультимерный пептид по настоящему изобретению является димерным пептидом.

В некоторых вариантах осуществления мультимерный пептид, такой как димерный пептид, содержит два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять или десять мономерных пептидов со структурой X^1 - X^2 - X^3 - X^4 - X^5 - X^6 , определенной в табл. 1.

В некоторых вариантах осуществления в пептиде по настоящему изобретению последовательность X^2 , и/или X^4 , и/или X^6 определяет последовательность из 4-17, например 5-16, например 5-15, например 5-14, например 5-13, например 5-12, например 5-10 аминокислот.

В некоторых вариантах осуществления в пептиде по настоящему изобретению последовательность X^2 , и/или X^4 , и/или X^6 определяет последовательность более чем из 5, например более чем 6, например более чем 7, например более чем 8, например более чем 9, например более чем 10, например более чем 11, например более чем 12, например более чем 13, например более чем 14, например более чем 15, например более чем 16 аминокислот.

В некоторых вариантах осуществления в пептиде по настоящему изобретению последовательность X^2 , и/или X^4 , и/или X^6 определяет последовательность менее чем из 17, например менее чем 16, например менее чем 15, например менее чем 14, например менее чем 13, например менее чем 12, например менее чем 11, например менее чем 10, например менее чем 9, например менее чем 8, например менее чем 7, например менее чем 6 аминокислот.

В некоторых вариантах осуществления в пептиде по настоящему изобретению последовательность X^1 , и/или X^3 , и/или X^5 определяет последовательность, которая содержит одну или более аминокислот, выбранных из глицина (G), аргинина (R), норлейцина (Nle), аспарагиновой кислоты (D), глутаминовой кислоты (E), глутамина (Q), серина (S), лизина (K), триптофана (W), цистеина (C), орнитина, диаминопропионовой кислоты (Dpr) или их производных.

В некоторых вариантах осуществления в пептиде по настоящему изобретению мономерный пептид содержит одну или более внутримолекулярных связей, таких как одну или более Cys-Cys-связей.

В некоторых вариантах осуществления в пептиде по настоящему изобретению мономерный пептид обладает замедленной протеолитической деградацией в N-конце, например, за счет включения первых 1, 2 или 3 аминокислот в N-конце в D-форме или за счет включения первых 1, 2 или 3 аминокислот в N-конце в бета- или гамма-форме.

В некоторых вариантах осуществления в мультимерном пептиде, таком как димерный пептид по настоящему изобретению, два или более мономерных пептидов являются идентичными по последовательности.

В некоторых вариантах осуществления в мультимерном пептиде, таком как димерный пептид по настоящему изобретению, два или более мономерных пептидов являются различными по последовательности.

В некоторых вариантах осуществления в мультимерном пептиде, таком как димерный пептид по настоящему изобретению, одна, две или более пептидных цепей мультимерного пептида, такого как димерный пептид, обладает замедленной протеолитической деградацией в N-конце, например, за счет включения первых 1, 2 или 3 аминокислот в N-конце в D-форме или за счет включения первых 1, 2 или 3 аминокислот в N-конце в бета- или гамма-форме.

В некоторых вариантах осуществления в мультимерном пептиде, таком как димерный пептид по настоящему изобретению, линкер находится внутри любой последовательности, выбранной из X^1 , X^2 , X^3 , X^4 , X^5 и X^6 , например X^1 , X^2 или X^3 первого мономерного пептида с любым местом по меньшей мере в одном втором мономерном пептиде, например внутри последовательности X^1 , X^2 или X^3 .

В некоторых вариантах осуществления в мультимерном пептиде, таком как димерный пептид по настоящему изобретению, линкер находится в аминокислотном положении, выбранном из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60 положения первого мономерного пептида с положением, выбранным из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60 положения по меньшей мере одного второго мономерного пептида.

В некоторых вариантах осуществления в мультимерном пептиде, таком как димерный пептид по настоящему изобретению, линкер находится в X^1 , X^2 или X^3 первого мономерного пептида с любым местом по меньшей мере в одном втором мономерном пептиде, например внутри последовательности X^1 , X^2 или X^3 .

В некоторых вариантах осуществления в мультимерном пептиде, таком как димерный пептид по настоящему изобретению, мультимерный пептид, такой как димерный пептид, содержит эпитоп хелпера по меньшей мере из 12 аминокислот, например по меньшей мере из 13, 14, 15 или 17 аминокислот, где данный эпитоп хелпера состоит из объединенной последовательности аминокислот, которая является последовательностью аминокислот из первого мономерного пептида и последовательностью аминокислот по меньшей мере из одного второго мономерного пептида, например из 2-12 аминокислот из первого мономерного пептида и 2-12 аминокислот по меньшей мере из одного второго мономерного пептида.

Очевидно, понятно, что эпитоп может находиться не только в последовательности мономерного пептида. Также эпитоп может находиться с комбинацией аминокислот первого и по меньшей мере второго мономерного пептида в мультимерном пептиде, таком как последовательность димерного пептида, где данная комбинация аминокислот образует последовательность, которая простирается от первой по меньшей мере к последовательности одного второго мономерного пептида. Данный эпитоп может представлять непрерывную последовательность аминокислот или может представлять трехмерный эпитоп с аминокислотами, встречающимися в обоих мономерных пептидах.

В некоторых вариантах осуществления в мультимерном пептиде, таком как димерный пептид по настоящему изобретению, межмолекулярная связь является дисульфидной (S-S) связью между двумя остатками Cys.

В некоторых вариантах осуществления в мультимерном пептиде, таком как димерный пептид по настоящему изобретению, межмолекулярная связь является метилированной пептидной связью между боковой цепью N-с-метилованного Lys и боковой цепью остатка Asp или Glu.

В некоторых вариантах осуществления в мультимерном пептиде, таком как димерный пептид по настоящему изобретению, межмолекулярная связь является тиоэфирной связью между остатком Cys в первом мономерном пептиде и модифицированным остатком Lys по меньшей мере в одном втором мономерном пептиде.

В некоторых вариантах осуществления в мультимерном пептиде, таком как димерный пептид по настоящему изобретению, межмолекулярная связь является оксимной связью.

В некоторых вариантах осуществления в мультимерном пептиде, таком как димерный пептид по настоящему изобретению, межмолекулярная связь является оксимной связью между остатком дериватизированного Lys в первом мономерном пептиде и остатком дериватизированного Ser по меньшей мере во втором мономерном пептиде.

В некоторых вариантах осуществления в мультимерном пептиде, таком как димерный пептид по настоящему изобретению, межмолекулярная связь является оксимной связью между остатком дериватизированного лизина, орнитина или диаминопропионовой кислоты в первом мономерном пептиде и дериватизированной группой серина, такой как остаток серина, например в остатке серинилдиаминопропионовой кислоты, например в остатке сериниллизина или в остатке серинилорнитина, по меньшей мере в одном втором мономерном пептиде.

В некоторых вариантах осуществления в мультимерном пептиде, таком как димерный пептид по настоящему изобретению, мономерные пептиды связаны полиэтиленгликолем (ПЭГ) линкером, например, через остаток Asp или Glu в первом мономерном пептиде и через остаток Asp или Glu по мень-

шей мере в одном втором мономерном пептиде.

В некоторых вариантах осуществления в мультимерном пептиде, таком как димерный пептид по настоящему изобретению, любой из указанных мономерных пептидов независимо определяется в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления пептид по настоящему изобретению, по существу, не является проникающим в клетки пептидом. В других вариантах осуществления пептид по настоящему изобретению, по существу, является проникающим в клетки пептидом. В некоторых вариантах осуществления пептид по настоящему изобретению способен присоединяться к клеточной мембране антигенпредставляющей клетки.

Очевидно, понятно, что при упоминании о способности пептидов присоединяться или поступать в клетку, такую как антигенпредставляющая клетка, это может быть обращено к полной последовательности пептида, а также ее фрагменту, такому как фрагмент, представляющий эпитоп. Следовательно, это может быть тот случай, когда полная последовательность представляет, по существу, не проникающий в клетку пептид, в то время как фрагмент пептида способен эффективно проникать в клетку, такую как антигенпредставляющая клетка.

В некоторых вариантах осуществления пептид по настоящему изобретению не является пептидом или димерным пептидом, конкретно раскрытым в международной заявке на патент PCT/DK 011/050460.

В некоторых вариантах осуществления пептид по настоящему изобретению не является пептидом или димерным пептидом, конкретно раскрытым в международной заявке на патент PCT/EP 2010/059513, например, выбранным из

CGGAKRRVVGAKRRVVGQREKRAV (SEQ ID NO:115)

CGGGDQQLLGGAEIIIIVGGIEEEGGERDRDR (SEQ ID NO:116)

CGGAKRRVVGAKRRVVGQREKR (SEQ ID NO:117)

CGGGDQQLLGGAEIIIIVGGIEEEGG (SEQ ID NO:118)

CGGAEIIIIVVGDDQQLL (SEQ ID NO:119)

GCGGAKRRVVGAKRRVV (SEQ ID NO:120)

GAKRRVVGCGGAKRRVVQREKRAGEREKRA (SEQ ID NO:121)

GKGGIEEEGGERDRDRGGEQDRDR (SEQ ID NO:122)

GAKRRVVGCGGAKRRVVQREKRAGEREKRA (SEQ ID NO:123)

GKGGIEEEGGERDRDRGGQDRDR (SEQ ID NO:124)

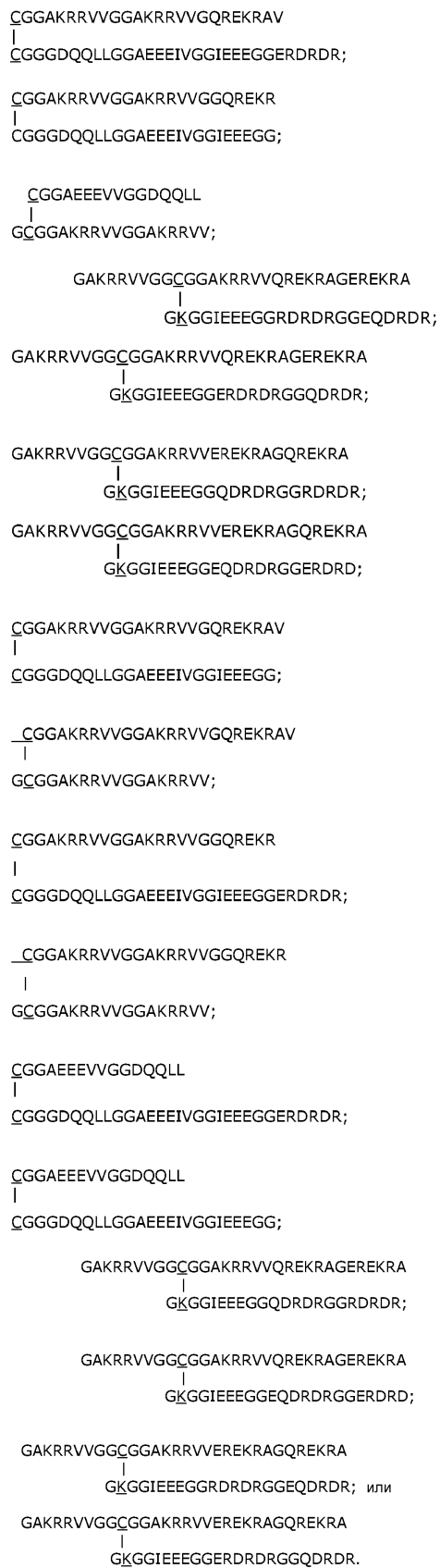
GAKRRVVGCGGAKRRVVEREKRAGQREKRA (SEQ ID NO:125)

GKGGIEEEGQDRDRGGRDRDR (SEQ ID NO:126)

GAKRRVVGCGGAKRRVVEREKRAGQREKRA (SEQ ID NO:127)

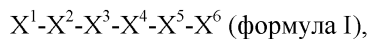
GKGGIEEEGGEQDRDRGGGERDRD (SEQ ID NO:128)

В некоторых вариантах осуществления пептид по настоящему изобретению не является димерным пептидом, выбранным из (пептиды связаны посредством подчеркнутой аминокислоты)



Пронумерованные варианты осуществления настоящего изобретения:

1. Выделенные мономерные пептиды, содержащие не более чем 60 аминокислот, со следующей структурой:



где X^1 , X^3 и необязательная группа X^5 каждая независимо определяет линейную последовательность из любых 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот, независимо выбранных из глицина, аргинина, норлейцина,

глутамин, серин, лизин, триптофан, цистеин или их производного; X^2 , X^4 и необязательная группа X^6 каждая независимо определяет линейную последовательность из 5-17 аминокислот, где каждая обладает более чем 50% идентичностью последовательности со специфическим природным антигеном.

2. Выделенный мономерный пептид по варианту осуществления 1, где X^2 , и/или X^4 , и/или X^6 обладают более чем 55%, например более чем 60%, например более чем 65%, например более чем 70%, например более чем 75%, например более чем 80%, например более чем 85%, например более чем 90%, например более чем 95%, например более чем 96%, например более чем 97%, например более чем 98%, например более чем 99%, например 100% идентичностью последовательности со специфическим природным антигеном.

3. Выделенный мономерный пептид по вариантам осуществления 1 или 2, где специфический природный антиген представляет белковую или пептидную последовательность, полученную из антигена, вызывающего заболевание, такого как инфекционный агент, такой как бактерии, вирус, паразит, грибы или раковые антигены, такой как онкоген (при раке легких, желудка, молочной железы), или антигена, вызывающего аутоиммунное заболевание, такое как диабет, рассеянный склероз (MS), целиакия, миалгический энцефаломиелит (ME), псориаз и/или болезнь Крона.

4. Выделенный мономерный пептид по одному из вариантов осуществления 1-3, где указанный специфический природный антиген представляет собой вирусный белок, такой как структурный белок, такой как капсидный белок, регуляторный белок, ферментный белок и протеолитический белок.

5. Выделенный мономерный пептид по одному из вариантов осуществления 1-4, где указанный вирусный белок представляет собой белок, такой как белок ядра, вируса, выбранного из вируса гепатита С; вируса гриппа, такой как белок М2, вируса иммунодефицита человека (ВИЧ), цитомегаловируса (CMV) и папилломавируса человека (HPV).

6. Выделенный мономерный пептид по варианту осуществления 5, где указанный вирусный белок представляет собой вирусный белок вируса гепатита С, выбранный из любой одной консенсусной последовательности HCV конкретного генотипа, такого как генотип 1, например субтипы 1a и 1b, генотип 2, например субтипы 2a и 2b, генотип 3, например субтипы 3a и 3b, генотип 4, генотип 5 и генотип 6.

7. Выделенный мономерный пептид по одному из вариантов осуществления 1-3, где последовательность аминокислот, определяемая X^1 - X^2 - X^3 - X^4 - X^5 - X^6 , отсутствует в нативной последовательности указанного природного антигена.

8. Выделенный мономерный пептид по одному из вариантов осуществления 1-7, где данный мономерный пептид состоит из 18-60 аминокислот, например из 19-60 аминокислот, например из 20-60 аминокислот, например из 21-60 аминокислот, например из 22-60 аминокислот, например из 23-60 аминокислот, например из 24-60 аминокислот, например из 25-60 аминокислот, например из 26-60 аминокислот, например из 27-60 аминокислот, например из 28-60 аминокислот, например из 29-60 аминокислот, например из 30-60 аминокислот, например из 31-60 аминокислот, например из 32-60 аминокислот, например из 33-60 аминокислот, например из 34-60 аминокислот, например из 35-60 аминокислот, например из 36-60 аминокислот, например из 37-60 аминокислот, например из 38-60 аминокислот, например из 39-60 аминокислот, например из 40-60 аминокислот, например из 42-60 аминокислот, например из 44-60 аминокислот, например из 46-60 аминокислот, например из 48-60 аминокислот, например из 50-60 аминокислот, например из 52-60 аминокислот, например из 54-60 аминокислот, например из 56-60 аминокислот, например из 58-60 аминокислот.

9. Выделенный мономерный пептид по одному из вариантов осуществления 1-8, где данный мономерный пептид состоит из 18-60 аминокислот, например 18-58 аминокислот, например 18-56 аминокислот, например 18-54 аминокислот, например 18-52 аминокислот, например 18-50 аминокислот, например 18-48 аминокислот, например 18-46 аминокислот, например 18-44 аминокислот, например 18-42 аминокислот, например 18-40 аминокислот, например 18-39 аминокислот, например 18-38 аминокислот, например 18-37 аминокислот, например 18-36 аминокислот, например 18-35 аминокислот, например, 19-34 аминокислот, например 18-33 аминокислот, например 18-32 аминокислот, например 18-31 аминокислот, например 18-29 аминокислот, например 18-28 аминокислот, например 18-27 аминокислот, например 18-26 аминокислот, например 18-25 аминокислот, например 18-24 аминокислот, например 18-23 аминокислот, например 18-22 аминокислот, например 18-21 аминокислот, например 18-20 аминокислот, например 18-19 аминокислот.

10. Выделенный мономерный пептид по одному из вариантов осуществления 1-9, где данный мономерный пептид состоит не более чем примерно из 55 аминокислот, например не более чем примерно 50 аминокислот, например не более чем примерно 45 аминокислот, например не более чем примерно 40 аминокислот, например не более чем примерно 38 аминокислот, например не более чем примерно 36 аминокислот, например не более чем примерно 34 аминокислот, например не более чем примерно 32 аминокислот, например не более чем примерно 30 аминокислот, например не более чем примерно 28 аминокислот, например не более чем примерно 26 аминокислот, например не более чем примерно 24 аминокислот, например не более чем примерно 22 аминокислот, например не более чем примерно 20 аминокислот, например не более чем примерно 18 аминокислот, например не более чем примерно 16 аминокислот, например не более чем примерно 14 аминокислот, например не более чем примерно 12

аминокислот, например не более чем примерно 10 аминокислот.

11. Выделенный мономерный пептид по одному из вариантов осуществления 1-10, где данный мономерный пептид состоит по меньшей мере примерно из 10 аминокислот, например по меньшей мере примерно 12 аминокислот, например по меньшей мере примерно 14 аминокислот, например по меньшей мере примерно 16 аминокислот, например по меньшей мере примерно 18 аминокислот, например по меньшей мере примерно 20 аминокислот, например по меньшей мере примерно 22 аминокислот, например по меньшей мере примерно 24 аминокислот, например по меньшей мере примерно 26 аминокислот, например по меньшей мере примерно 28 аминокислот, например по меньшей мере примерно 30 аминокислот, например по меньшей мере примерно 32 аминокислот, например по меньшей мере примерно 34 аминокислот, например по меньшей мере примерно 36 аминокислот, например по меньшей мере примерно 38 аминокислот, например по меньшей мере примерно 40 аминокислот, например по меньшей мере примерно 45 аминокислот, например по меньшей мере примерно 50 аминокислот, например по меньшей мере примерно 55 аминокислот, например по меньшей мере примерно 60 аминокислот.

12. Выделенный мономерный пептид по одному из вариантов осуществления 1-11, где общий суммарный заряд X^1 - X^2 - X^3 - X^4 - X^5 - X^6 равен или выше 0, например выше 1, 2, 3, 4 или 5.

13. Выделенный мономерный пептид по одному из вариантов осуществления 1-12, где указанный мономерный пептид способен индуцировать гуморальный иммунный ответ.

14. Выделенный мономерный пептид по одному из вариантов осуществления 1-13, где указанная последовательность X^1 , и/или X^3 , и/или X^5 выбрана из RR, WWGC (SEQ ID NO:54), RRG, RRZC (SEQ ID NO:55), WWQC (SEQ ID NO:56), WW, RR-Har, Har, WDWGC (SEQ ID NO:57), CGG, CGGG (SEQ ID NO:58), GCGG (SEQ ID NO:59), G, GKG, GC, GG, C, R, GCG, GRR, GGCGG (SEQ ID NO:60), CGGKG (SEQ ID NO:61), CGGKGG (SEQ ID NO:62), GGKGG (SEQ ID NO:63), KG и GWK.

15. Выделенный мономерный пептид по одному из вариантов осуществления 1-14, где указанная последовательность X^2 , и/или X^4 , и/или X^6 выбрана из SLLTEVETP (SEQ ID NO:64), SLZTDIETP (SEQ ID NO:65), TDIET (SEQ ID NO:66), CSLLT (SEQ ID NO:67), SLLTEVQTPIRN (SEQ ID NO:68), TPIR-SEWGCRSN (SEQ ID NO:69), IDTPIR (SEQ ID NO:70), AKRRV (SEQ ID NO:71), IEEEG (SEQ ID NO:72), AKRRVV (SEQ ID NO:73), DQQLL (SEQ ID NO:74), AEEEVV (SEQ ID NO:75), GIEEG (SEQ ID NO:76), IEEEGGRDRDR (SEQ ID NO:77), CAKRRVVC (SEQ ID NO:78), IEEEGGERDRDR (SEQ ID NO:79), IEEEGGQDRDR (SEQ ID NO:80), IEEEGGEQDRDR (SEQ ID NO:81), EEEGGRDRD (SEQ ID NO:82), RLEPWKH (SEQ ID NO:83), FHSQV (SEQ ID NO:84), FITKGLGISY (SEQ ID NO:85), LLADARVCS (SEQ ID NO:86), GV(Nle)AGIAYFS (SEQ ID NO:87), VETPIR (SEQ ID NO:88), VETPIRN (SEQ ID NO:89), SNDSS (SEQ ID NO:90), TPIBQDWG (SEQ ID NO:91), AKRRVVQREKRA (SEQ ID NO:92), IEEEGGERDR (SEQ ID NO:93), AEEEIV (SEQ ID NO:94), RDRDR (SEQ ID NO:95), ERDRDR (SEQ ID NO:96), AKRRVVEREKRA (SEQ ID NO:97), QDRDR (SEQ ID NO:98), EQDRDR (SEQ ID NO:99), RDRDQ (SEQ ID NO:100), GSQPKTA (SEQ ID NO:101), FITKGLGISYGRK (SEQ ID NO:102), LLADARVSA (SEQ ID NO:103), GVLAGIAYYS (SEQ ID NO:104), TPIRNEWG (SEQ ID NO:105), SEWGSRSN (SEQ ID NO:106), SLZTDIETPG (SEQ ID NO:107), QREKRAV (SEQ ID NO:108), QREKR (SEQ ID NO:109), IEEEGG (SEQ ID NO:110), EREKR (SEQ ID NO:111), QREKRA (SEQ ID NO:112), ERDRD (SEQ ID NO:113) и HPGSQ (SEQ ID NO:114).

16. Выделенный мономерный пептид по одному из вариантов осуществления 1-15, где указанный мономерный пептид содержит по меньшей мере одну аминокислоту, выбранную из остатка Cys, Lys, Ser, Asp и Glu или их производных.

17. Выделенный мономерный пептид по одному из вариантов осуществления 1-16, где указанная последовательность X^1 , и/или X^3 , и/или X^5 определена в табл. 1.

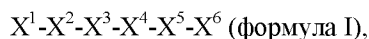
18. Выделенный мономерный пептид по одному из вариантов осуществления 1-17, где последовательность X^2 , и/или X^4 , и/или X^6 определена в табл. 1.

19. Выделенный мономерный пептид по одному из вариантов осуществления 1-18, где указанная последовательность X^2 , и/или X^4 , и/или X^6 определяет последовательность из 4-17, например 5-16, например 5-15, например 5-14, например 5-13, например 5-12, например 5-10 аминокислот.

20. Выделенный мономерный пептид по одному из вариантов осуществления 1-19, где мономерный пептид содержит одну или более внутримолекулярных связей, таких как одна или более Cys-Cys-связей.

21. Выделенный мономерный пептид по одному из вариантов осуществления 1-20, где данный мономерный пептид обладает замедленной протеолитической деградацией в N-конце, например, за счет включения первых 1, 2 или 3 аминокислот в N-конце в D-форме или включения первых 1, 2 или 3 аминокислот в N-конце в бета- или гамма-форме.

22. Выделенный мультимерный пептид, такой как димерный пептид, содержащий два или более мономерных пептидов, где каждый мономерный пептид независимо содержит не более чем 60 аминокислот со следующей структурой:



где X^1 , X^3 и необязательная группа X^5 каждая независимо определяет линейную последовательность из любых 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот, независимо выбранных из глицина, аргинина, норлейцина, глутамина, серина, лизина, триптофана, цистеина или их производного; X^2 , X^4 и необязательная группа

X^6 каждая независимо определяет линейную последовательность из 5-17 аминокислот, где каждая обладает более чем 50% идентичностью последовательности со специфическим природным антигеном, где указанные мономерные пептиды ковалентно соединены одной или более межмолекулярными связями.

23. Выделенный димерный пептид по варианту осуществления 22, где два или более мономерных пептида являются идентичными по последовательности.

24. Выделенный димерный пептид по варианту осуществления 22, где два или более мономерных пептида являются различными по последовательности.

25. Выделенный мультимерный пептид, такой как димерный пептид по одному из вариантов осуществления 22-24, где одна или более пептидных цепей мультимерного пептида, такого как димерный пептид, обладает замедленной протеолитической деградацией в N-конце, например, за счет включения первых 1, 2 или 3 аминокислот в N-конце в D-форме или включения первых 1, 2 или 3 аминокислот в N-конце в бета- или гамма-форме.

26. Выделенный мультимерный пептид, такой как димерный пептид по одному из вариантов осуществления 22-25, где линкер находится внутри любой последовательности, выбранной из X^1 , X^2 , X^3 , X^4 , X^5 и X^6 , например X^1 , X^2 или X^3 первого мономерного пептида с любым местом по меньшей мере в одном втором мономерном пептиде, например, внутри последовательности X^1 , X^2 или X^3 .

27. Выделенный мультимерный пептид, такой как димерный пептид по одному из вариантов осуществления 22-26, где мультимерный пептид, такой как димерный пептид, содержит эпитоп хелпера по меньшей мере из 12 аминокислот, например по меньшей мере из 13, 14, 15 или 17 аминокислот, где данный эпитоп хелпера состоит из объединенной последовательности аминокислот, которая является последовательностью аминокислот из первого мономерного пептида и последовательностью аминокислот по меньшей мере из одного второго мономерного пептида, например из 2-12 аминокислот из первого мономерного пептида и 2-12 аминокислот по меньшей мере из одного второго мономерного пептида.

28. Выделенный мультимерный пептид, такой как димерный пептид по одному из вариантов осуществления 22-27, где указанная межмолекулярная связь выбрана из дисульфидной (S-S) связи между двумя остатками Cys.

29. Выделенный мультимерный пептид, такой как димерный пептид по одному из вариантов осуществления 22-28, где указанная межмолекулярная связь является тиоэфирной связью между остатком Cys в первом мономерном пептиде и остатком модифицированного Lys по меньшей мере в одном втором мономерном пептиде.

30. Выделенный мультимерный пептид, такой как димерный пептид по одному из вариантов осуществления 22-29, где указанная межмолекулярная связь является оксимной связью между остатком дериватизированного Lys в первом мономерном пептиде и остатком дериватизированного Ser по меньшей мере в одном втором мономерном пептиде.

31. Выделенный мультимерный пептид, такой как димерный пептид по одному из вариантов осуществления 22-30, где указанная межмолекулярная связь является метилированной пептидной связью между боковой цепью N-s-метилованного Lys в первом мономерном пептиде и боковой цепью остатка Asp или Glu по меньшей мере в одном втором мономерном пептиде.

32. Выделенный мультимерный пептид, такой как димерный пептид по одному из вариантов осуществления 22-31, где указанные мономерные пептиды связаны полиэтиленгликолем (ПЭГ) линкером, например, через остаток Asp или Glu в первом мономерном пептиде и остаток Asp или Glu по меньшей мере в одном втором мономерном пептиде, или полилизиновым ядром.

33. Выделенный мультимерный пептид, такой как димерный пептид по одному из вариантов осуществления 22-31, где любой из указанных мономерных пептидов независимо определяется в одном из вариантов осуществления 1-21.

34. Композиция, содержащая два или более соединений, выбранных из мономерного пептида по одному из вариантов осуществления 1-21 и выделенного мультимерного пептида, такого как димерный пептид по одному из вариантов осуществления 22-33.

35. Применение пептида, выбранного из мономерного пептида по одному из вариантов осуществления 1-21 и выделенного мультимерного пептида, такого как димерный пептид по одному из вариантов осуществления 22-33, для индукции гуморального иммунного ответа у субъекта.

36. Выделенная нуклеиновая кислота или полинуклеотид, кодирующий пептид по одному из вариантов осуществления 1-33.

37. Вектор, содержащий нуклеиновую кислоту или полинуклеотид по варианту осуществления 36.

38. Клетка-хозяин, содержащая вектор по варианту осуществления 37.

39. Иммуногенная композиция, содержащая по меньшей мере один мономерный пептид по одному из вариантов осуществления 1-21, выделенный мультимерный пептид, такой как димерный пептид по одному из вариантов осуществления 22-33, пептидную композицию по варианту осуществления 34, нуклеиновую кислоту или полинуклеотид по варианту осуществления 36 или вектор по варианту осуществления 37; в комбинации с фармацевтически приемлемым разбавителем или носителем и необязательно иммунологическим адъювантом.

40. Иммуногенная композиция по варианту осуществления 39 в форме вакцинной композиции.

41. Способ индукции иммунного ответа у субъекта против антигена, который включает введение по меньшей мере одного мономерного пептида по одному из вариантов осуществления 1-21, выделенного мультимерного пептида, такого как димерный пептид по одному из вариантов осуществления 22-33, пептидной композиции по варианту осуществления 34, нуклеиновой кислоты или полинуклеотида по варианту осуществления 36, или вектора по варианту осуществления 37, или композиции по одному из вариантов осуществления 39-40.

42. Способ снижения и/или замедления развития патологических эффектов антигена, вызывающего заболевание, такого как инфекционный агент у субъекта, зараженного указанным агентом или имеющего указанное заболевание, вызванное указанным антигеном, где способ включает введение эффективного количества по меньшей мере одного мономерного пептида по одному из вариантов осуществления 1-21, выделенного мультимерного пептида, такого как димерный пептид по одному из вариантов осуществления 22-33, пептидной композиции по варианту осуществления 34, нуклеиновой кислоты или полинуклеотида по варианту осуществления 36, или вектора по варианту осуществления 37; или композиции по одному из вариантов осуществления 39-40.

43. Пептид по одному из вариантов осуществления 1-33 для применения в качестве лекарственного препарата.

44. Пептид по одному из вариантов осуществления 1-33 для лечения патологических эффектов антигена, вызывающего заболевание, такого как инфекционный агент у субъекта, зараженного указанным агентом или имеющего указанное заболевание, вызванное указанным антигеном.

45. Пептид по одному из вариантов осуществления 1-33 для применения в тесте *in vitro*, таком как анализ ELISA, например, для диагностических целей.

46. Применение пептида по одному из вариантов осуществления 1-33 в тесте *in vitro*, таком как анализ ELISA, например, для диагностических целей.

Перечень последовательностей (аминокислоты, выделенные жирным шрифтом, представляют подходящие антигенные последовательности, которые можно использовать в виде одной из X^2 , и/или X^4 , и/или X^6 , как определено в формуле (I) настоящего изобретения).

```
SEQ ID NO:1: Flu M2
>gi|21693176|gb|AA075162| /Human/M2/H1N1/Puerto Rico/1934/// матричный белок
M2 [вирус гриппа A (A/Puerto Rico/8/34/Mount Sinai(H1N1))]
MSLLTEVETPFRNEWGCRCRCNGSSDPLAIAANIIG-LHLCLWLRLFRKCIYRRFKYGLKGGPSTEGVPK
SMREERYRKEQSAVDADDCHVFVIELE

SEQ ID NO:2: >gi|1906383|gb|AA050256.1 белок tat [вирус иммунодефицита
человека
1]MEFVDPRLFPWKHPGSPKPTACTNCTCYCKCCFHCQVCFITKALGISYGRKKRRQRRRAHQNSQTHQASLS
KQPTSQPRGDPSTGPKE

SEQ ID NO:3: >B.FR.1983.HXB2-LAI-IIIB-BRU (gp120)
MRVKEYQHLNRWGRWGTMLLCMLMCSATEKLWVTYVYGVVWKEATTTLFCASDAKAYDTEVHNWATHACV
PTDPNPQEVVLNVNTEFNMMKNDMVEQMHEDIISLWDQSLKPCVKLTPLCVSLKCTDLKNDNTNSSCRMIME
KGEIKNCSFNISTIRGKVQKEYAFFYKLDIIPIDNDTSYKLTSCNISTVITQACPKVSEFPIPIHYCAPAGFAI
LKNKNTFNGTGPCINVSTVQCTHGIRPVVSTQLLINGSIAEEVVIRSVNFTDNAKTIIIVQLNTSVEINCRPN
NNTKRRIIRIQRGPGRAFVTIIGKIGNMRQAHNCISRAKWNNTLKQIAASKLSEQFGNNKTIIFKQSSGGDPEIVTHS
FNCGGEFFYCNSTQLFNTWFSNWTSTEGSNTEGSDTTLPCRIKQIINMWQKVKAMYPPIISQIRCSSNIT
GLLLTRDGGNSNNESEIFRPGGDMRDNRSELYRYKVVKIEPLGVAPTAKRRVVQREKR

SEQ ID NO:4: HIV gp41
>B.FR.1983.HXB2-LAI-IIIB-BRU (ACC No. K03455)
AVCICALFLCFLCAACSTHCAASMTLTQARGLLSCIVQQNNLLRAIEAQHLLQLTVWCIKOQARILAVERY
IKDQQLLCIWCSSGKLCITTAVPWNASWNSKLEQIWNHTWMEWDREINVTSLIHSLSQSQKQKNOELL
ELDKWASLNNWFNIWNWLYKLFIMIVGGLVGLRIVEAVLS-VNRYRQCYSPLSFQTHLPTPRGDRPEGIEEE
GGERDRDRSIRLVNGLALIWDDLRLSLCLFSYHRLRLDLLIVTRIVELLRRGWEALYWNWLLQYWSQELKNSA
VSLNATAIAVAECTDRVIEVVQACRAIRHPRIRQGLERILL

SEQ ID NO:5: >1b.1.AB016785.1 (HCV-E1)
YEVNVSQVYHVTNDCSNSSIVYGAADIMHTPGCVPCVRENNSRCWVALTPTLAARNRISPTTIRRHVDLLV
GAAAFCSAMYVVDLCGSVFLVSLQFTFSRRYETVQDCNCSLYPCHVSGHRMAWDMMMNWSPTAALVVSQLLRIP
QAVVDMVTGAHWGLAGLAYYSMVGNWAKVLIVMLLFAVDG

SEQ ID NO:6: >1b.1.AB016785.AB016785
TTHVTGGTGRTTLGITAMFAFGPHQKLQLINTNGSWH-NRTALNCNCSLNTGFLAALFYARKFNSSCCPERMAS
CRPIDKFGQWGPITHAVPDNLQDRPYCWHYAPQPCGI-PASQVCGPVYCFIPSPVVVGTIDRFGAPTYTWGENE
TDVLLNNTRPPQGNWFGCTWMNGTGFAKTCGGPPCNIGVGNNLTCTPTDCFRKHPEATYTKCGSGPWLTPROM

VDYPYRLWHYPCTVNETIFKVRMYVGGVEHRLTAACNWTGERCDLEDRDRSELSPLLLSTTEWQVLPCSFITLPL
ALSTGLIHLHQINVDVQYLYGVGSAAVSVIVIKWEYILLFLLLADARVCACLWMMMLIAQAEA
```


SEQ ID NO:7: инвентарный номер по AF009606; ген полибелка вируса гепатита C субтипа 1a, complete cds

```

MSTNPKPQRKTKRNTNRRPDQVKFPGGGQIVGGVYLLPRRGPRLL
GVRATRKTSERSQPRGRRQPIPKARRPEGKINAQGYFWPLYGNEGCGWAGWLLSPRG
SRPSWGPIDPRRRSRNLGKVIDLTTCGFADLMGYIPLVGAPLGVARALAHGVRVLED
GVNYATGNLPGCSFSIFLLALLSCLTVPASAVQVNSGGLYHVNDCPNSSIVYEAAD
ALLHTPGCVPCVREGNASRCWVAIPTVATRDGKLPITQLRRHIDLVGSAITLCSALY
VGDLCGSVFLVQSLFTFSPPRRHWITQDCNCSIYPGHIIGHRAMDMMMNWSPITALVV
AQLLRIPQAIMMADIAGAHWVLAGIAYFSMVGNWAKVLVLLFAGVDAEHTVGGSA
GRITTAGLVGLTPGAKNIQLINTNGSWHINSTALNCNESLNTGWLAGLIFYQHKFNSS
GCPERLASCRRLTDFAQGWGPISYANGSGLDERPYCWHYPPRPGGIVPAKSVCGPVYC
FTPSPVVVGITDRSGAPITYSWGANDTDVFLNNTRPPLGNWFGCTWMNSTGFTKVCGA
PPCVIGGVGNNTLLCPTDCFRKHPEATYSRCGSGWITPRCMVDIPIYRLWHYPCITINY
TIFKVRMYVGGVEHRLDAACNWTIRGERCDLEDRRSELSPLLSTTQWVLPCEFTTLL
PALSTGLIHLHQNIQIVDIQYLYGVSSSIASHWAKWEVYVLLFLLADARVCSCLWMMLL
ISQAEAALENLVLNNAASLAGTHGLVSFLVFCEAWYIKGRWVFGAVAYFGWMPPLL
LLLALPQRAYALDEVAASCGGVVLVGLMALTLSPYKYRYSWCMWLOFLTRVEAQ
LHVWVFPPLNVRGGRDAVILLMCVVPHELFDITKLLAIFGPLMWLQASLLKVIFYVR
VQGLLRICALARKIAGGHYVQMAIKLGALTGTYYVNHITPLRDWAHNGLRDLAVAVE
PVVFSRMEKTLITWAGDTAACGDIINGLPVSARRGQELLGPADGMVSKGWRLLAPIT
AYAQQTRGLLGCIIITSLTGRDKNOVEGEVQIVSTATQFTLATCINGVCWTVYHGAGTR
TIASPKGPVIQMYTINVDDQLVGWPAPOGGRSLTPTCGSSDLYLVTRHADVIPVRRRG
DSRGSLLSFRPISYLKSSSGGLPCPAGHAVGLFRAAVCTRGVAKAVDFIPVENLETT
MRSPVFTDNPSPPAVPQTFQVAHLHAPITGSGKSTRVPAAYAAQGYKVLVLPNSVAALT
GFGAYMSKAHGDVDPNIRGTVRTITIGAPITYSYGKFLADGGSGGAYDIIICDECHS
TDSTTIYIGITVLQDAETAGARLVVLATATPPGSVTVPHNLNIEVALSNTGEIPFYGK
AIPLEVIKGGRHILFCHSKKKCDELAAKLVAGINAVAYRGLDVSVIPTSQDVVVVA
TDALMTGFTGDFSDVIDCNTCVITQVDFSLDPTFTIETITLVPQDAVSRQRRGRTGRG
KPGIYRFVAPGERPSGMFSSVLCBCEYDAGCAWYELTFAETTVLRAYLNTFGLPVCQ
DHLEFSEGVTGLTHIDAHFLSQTKQSGENFPYLVAYQATVCARAQAPPPSWDEQMWKC
LIRLKPFLHGFPTLLYRLGAVQNEVLTHTPIKTYIMTCSADLEVVTSTWVLVGGVLA
ALAAAYCLTSGVVIVGRIILSGKPAIIPDREVLVQEFDEMEECQHLPIYEQGMMLAE
QFKQKALGLLQATASQAEVITPAVQTNWQKLEVFMAKHMWNFISGIQYLAGSLTLPGN
PAIRSPMAFTASITSLTTOHTLLENLGGWAAQLAPPSAASAFVAGIAGAAGVTI
GLGKVLVDILAGYGAGVAGALVAFKIMSGEVPSTEDLVNLLPALISPGALVVGIVCAA
ILRRHVGPGEQVQWMNRLIAFASRGNHVSPRHYVPESEPAARVQILSSLTITQLLK
RLHQWISSECTTPCSGSWLRDIWDWICEVLSDFKTLWKAKLMPQLGPFIQVSCQGRYR
GVWRGDDGIMHTTCHCGAEITGHVKNGTMRIVGPRTCNRMWSGTFPINAYITGPCTPSP
APNYKFALWRVSAEEYVEIVRGDFHYVSGMTTNDLKCPCQIPSEFFTELDGVRLLHR
FAPPCKPLLREEVSEFRVGLHEYPVGSQLPCEPEPDVAVLTSMLTDPSHITAEAAGRRL
ARGSPFSMASSASQLSAPSLKATCTANHDSPADLIEANLLWRQEMGGNITRVESEN
KVVLDSFDPDLRAEDEREVSVPAAELRKSRFARALEVFWARPDYNPPLVETWKKPDY
VPPVHGCPLPPRSPFPVPPRKRRTVVLTESTVLSALAEATKSPGSSSAGIDSGT
TITSEPAFGSGCFPSGDSVSESSMPLEGEFGDPDLSGDSWSTVSEKASEDVVCCSMS
YSWTGALVTPCAAEEQKLPINALSNSLLRHHNVYSTTSRSACQKQKVFDRQLQVL
DSHYQDVLEKVEKAAASKVKANLLSVEEACSLTPHSAKSKFGYGAQDVRCARKAVAH
INSVWKLLEDVSTPIDTITMAKNEVFCVQPEKGGRRKPARLIVFPDLGVRVCEKMALY
DVVSKPLAVMGSSYGFQYSPQRVEFLVQAWKSKKTFMGFSYDTRCFDSTVTESDIR
TEEAITYQCCDLFPQAVAIKSLTERLYVGGPLINSRGENGYRRCRASGLVLTISCGNT
LTCYIKARAAACRAAGLQDCTMLVCGDDLVVICESAGVQEDAASLRAFTAMTRYSAFP
GDPPOPEYDLELITSCSSNVSAHDGAGKRVYLTTRDPTPLARAAMEETARHTPVNSW
LGNIMFAPTLWARMILMTHFFSILLAEQLEKLTLDCCQIYGACYSIEPLDLPOIIERLH
GLSAFSLHSYSPGEINRVACLRLKGVPPLRAWRHARSVRARLLSSQGGRAATCGYL
LFNWAVRTKLKLTPIAAGRLDLSGWFVAGYSGGDIYHSLSHARPWFMLCLLLLAAG
VGIYLLFNR
```

SEQ ID NO:8: ядро белка HCV H77, инвентарный номер AF009606

Genbank номер: 2316097

>gi|2316098|gb|AAB66324.1| полипротейн [вирус гепатита C подтип 1a]

MSTNPKPQRKTKRNTNRRPDQVKFPGGGQIVGGVYLLPRRGPRLLGVRATRKTSERSQPRGRRQPIPKARR
PEGRTWAQGYFWPLYGNEGCGWAGWLLSPRGSRPSWGPIDPRRRSRNLGKVIDLTTCGFADLMGYIPLVGAPLGGAAR
ALAHGVRVLEDGVNYATGNLPGCSFSIFLLALLSCLTVPASA

SEQ ID NO:9:

мРНК вируса гепатита C, complete cds; инвентарный номер M96362 M72423;
вирус гепатита C субтип 1b

```

MSTNPKPQRKTKRNTNRRPDQIKFPGGGQIVGGVYLLPRRGPRLL
GVRATRKTSERSQPRGRRQPIPKARRPEGRAWAQGYFWPLYGNEGLGWAGWLLSPRG
SRPSWGPIDPRRRSRNLGKVIDLTTCGFADLMGYIPLVGAPLGVARALAHGVRVLED
GVNYATGNLPGCSFSIFLLALLSCLTVPASAYEVRNASGMHYHVNDCSNSSIVYEAAD
MIMHTPGCVPCVREDNSSRCWVALTPTLAARNASVPTTLRRHVDDLVGVAAFCSAMY
VGDLCGSVFLVQSLFTFSPPRRHWITQDCNCSIYPGRVSGHRMAWDMMMNWSPTITALVV
SOLLRIPQAVVDMVTGSHWGLAGLAYYSMVGNWAKVLIAMLLFAGVDGITHVTGGAQ
GRAASSLTSLFSPGFPQHLQLINTNGSWHINRTALSCNDSLNTGFWAALFYKYRFNAS
GCPERLATCRPIDTFAQGWGPITYTEPHLDQRPYCWHYAPQPCGIVPTLVQVCGPVYC
FTPSPVAVGITDRFGAPTYRWGANETDVLNLLNAGPPQGNWFGCTWMNGTGFTKTCGG
PPCNIGGVGNNTLLCPTDCFRKHFGATYTKCGSGWLTPRCLVDIPIYRLNHYPCITVNF
TIFKVRMYVGGAEHRLDAACNWTIRGERCDLEDRRSELSPLLSTTENVQVLPCEFTTLL
PALSTGLIHLHQNIQIVDIQYLYGIGSAVVSFAIKWEYIVLLFLLADARVCACLWMMLL
VAQAEAALENLVLNNAASVAGAHGILSFIVFFCEAWYIKGRVFGAAYALYGVWMPPLL
LLLALPPRAYAMDREMAASCGGAVFVGLVLLTSPHYKVLARFIWWLOYLITRTEAH
LQVWVFPPLNVRGGRDAIILLTCVVPHELFDITKYLLAIFGPLMWLQAGITRVPIYVR
AQLLRACMLARKVVGGHYVQVFMKLAALAGTYVYVDHLTPLRDWAHTGLRDLAVAVE
PVVFSMCKTIVITWAGDTAACGDIILLPASARRGKEILLGPADSLGQGGWRLLAPIT
AYSQQTRGLLGCIIITSITGRDKNOVEGEVQVVSATQSFLLATCINGVCWTVYHGAGSK
TLAGPKGFTIQMYTINVDDQLVGWPAEPGARSLTPTCGSSDLYLVTRHADVIPVRRRG
DGRGSLLEPPRPSYLVKSGSGGLPCFSGHAGVILPAAVCTRGVAMAVEFIPVESMETT
MRSPVFTDNPSPPAVPQTFQVAHLHAPITGSGKSTRVPAAYAAQGYKVLVLPNSVAALT
GFGAYMSKAHGDVDPNIRGTVRTITIGAPITYSYGKFLADGGSGGAYDIIICDECHS
TDSTTIYIGITVLQDAETAGARLVVLSATATPPGSVTVPHNLNIEVALSNTGEIPFYGK
AIPLEAIKGGRHILFCHSKKKCDELAAKLGLGLNNAVAYRGLDVSVIPTSQDVVVVA
TDALMTGFTGDFSDVIDCNTCVITQVDFSLDPTFTIETITVQDAVSRQRRGRTGRG
RAGIYRFVTPGERPSGMFSSVLCBCEYDAGCAWYELTFAETTVLRAYLNTFGLPVCQ
DHLEFSEGVTGLTHIDAHFLSQTKQAGENFPYLVAYQATVCARAQAPPPSWDEMWRC
LIRLKPFLHGFPTLLYRLGAVQNEVLTHTPIKTYIMTCSADLEVVTSTWVLVGGVLA
ALAAAYCLTSGVVIVGRIILSGKPAIIPDREVLVQEFDEMEECASHLPFYEQGMQLAE
QFKQKALGLLQATKQAEAAAPVVEKSWRALETFWAKHMWNFISGIQYLAGSLTLPGN
PAIRSPMAFTASITSLTTOHTLLENLGGWAAQLAPPSAASAFVAGIAGAAGVTI
GLGKVLVDILAGYGAGVAGALVAFKIMSGEMPSEADMVNLLPALISPGALVVGIVCAA
ILRRHVGPGEQVQWMNRLIAFASRGNHVSPRHYVPESEPAARVQILSSLTITQLLK
RLHQWINECDCTPCCSSSWLRINWDWICTVLTDFKTLWQSKLLPRLEFGVPFFSCQGRYK
GVWRGDDGIMHTTCHCGAQITGHVKNGSMRIVGPKTCSNTIWYGFPPINAYITGPCTPSP
APNYSKALWRVSAEEYVEIVRGDFHYVIGMTTNDVKNCPQVPAPEFFTEVDGVRLLHR
YAPACRPLLREEVVFQVGLHQYLVGSQLPCEPEPDVAVLTSMLTDPSHITAEAKRRL
ARGSPPSLASSASQLSAPSLKATCTTHHDSPADLIEANLLWRQEMGGNITRVESEN
KVVLDSFDPDLRAEDDEGEISVPAAELRKSRKFPFALPIWAPPDYNPPLLESWKDPDY
VPPVHGCPLPPTKAPPIPPRKRRTVVLTESTVLSALAEATKFTGSSGSSAIDSGT
ATAPPDQASGGDRESDVESFSMPLEGEFGDPDLSGDSWSTVSEKASEDVVCCSMS
YTWTGALITPCAAEESKLPINFLSNSLLRHHNVYATTSRSAGLRQKKVTFDRQLQVL
DHYRDVLKEMKAKSTVKAKLLSVEEACKLTPHSAKSKFGYGAQDVRLSSRAVTHI
RSVWKLLEDLETETPISTITMAKNEVFCVQPEKGGRRKPARLIVFPDLGVRVCEKMALYD
VVSTLFPQAVMGSSYGFQYSPQRVEFLVNTWKSKKCFMGFSYDTRCFDSTVTENDIRV
EESIYQCCDLAEAKLAIKSLTERLYVGGPLINSKGNQCYRRCRASGLVLTISCGNTL
TCYLKATAACRAAKLRDCTMLVNGDDLVVICESAGTQEDAASLRVFTAMTRYSAFP
GDPPOPEYDLELITSCSSNVSAHDGAGKRVYLTTRDPTPLARAAMEETARHTPVNSW
LGNIMYAPTLWARMILMTHFFSILLAEQLEKLTLDCCQIYGACYSIEPLDLPOIIERLH
GLSAFSLHSYSPGEINRVACLRLKGVPPLRAWRHARSVRARLLSSQGGRAATCGYL
```

FNWAVRTKLKLTPIAASRLDLSGWFVAGYSGGDIYHSLSRARPWFMLCLLLLSVG
GIYLLFNR

SEQ ID NO:10, нуклеокапсидный белок вируса гриппа A
 1 MASQGITKRSY EQMETSGERQ NATEIRASVG RMVGGIGRFY IQMCTELKLS DHEGRLIQNS
 61 ITIERMVLSA FDERNNKYLE EHPGAGKDPK KTGGPYRRR DGKWMRELIL YDKEEIRRIW
 121 QOANNGEDAT AGLTHMMIWH SNLNDATYQR TRALVRTGMD PRMCSLMQGS TLPRRSGAAG
 181 AAVKGVGIMV MELIRMIKRG INDRNFWRGE NGRTRIAYE RMCNILKGKF QTAAGRMMMD
 241 QVRESRNPQN AEIEDLIFLA RSALILRGSV AHKSCLPACV YGLAVASGYD FEREGYSLVG
 301 IDPFRLLQNS QVFSILRPNE NPAHKSQVLW MACHSAAFED LRVSSFRGT RVVPRGQLST
 361 RGVQIASNEN METMDSSTLE LRSRYWAIRT RSGGNTNQOR ASAGQISVQP TFSVQRNLFP
 421 ERATIMAAFT GNTGRTSDM RTEIIRMEN ARPEDVSFQG RGVFELSDEK ATNPVPSFSD
 481 MSNEGS

SEQ ID NO:11
 >gi|73919153|ref|YP_308840.1| матричный белок 2 [вирус гриппа A (A/New
 York/392/2004 (H3N2))]

MSLLTEVETPIRNEWGCRCDNS**SDPLVVAASIIIGILHLIL**WILDR**LFFKCVYRLFKHGLKRGFSTEGVPE** 70
SMREBYRKEQQNAVDADDSHFVSIELE

SEQ ID NO:12
 >gi|73919147|ref|YP_308843.1| нуклеокапсидный белок [вирус гриппа A (A/New
 York/392/2004 (H3N2))]
 MASQGITKRSYEQMETDGDQRNATEIRASVGKMGIDGIGRFYIQMCTELKLSDHEGRLIQNSLTIERMVLSA 70
 FDERNNKYLEEHPGAGKDPKKTGGPIYRRVNDGKWMRELVLVDKEEIRRIWRQANNGGDATAGLTHMMIWH 140
 SNLNDATYQRTALVRTGMDPRMCSLMQGSTLPRRSGAAGAAGVKGITVMVLMELIRMKRGINDRNFWRGE 210
 NGRKTR**SAYERMCNII**KGK**FQTAAGRMM**VDQVRESRNPNGAEIED**LIFLARSALILRG**S**VAHKS**CLPACA 280
 YGPAVSSGYDFEKEGYSLVGIDPFKLLQNSQIYSLIRPNENPAHKSQVLVMMACHSAAFEDLRLLSFIRGT 350
 KVSPRGKLSIRGVQIASNENMDNMGSSTLELRSGYWAIRTRSGGNTNQORASAGQTSVQPTFSVQRNLFP 420
 EKSTIMAAFTGNTGRTSDMRAEII RMMEGAKPEEVSFRGRGVFELSDEKATNPVPSFSDMSNEGSYFFG 490
 DNABEYDN
 --

SEQ ID NO:13
 >gi|56583270|ref|NP_040979.2| матричный белок 2 [вирус гриппа A (A/Puerto
 Rico/8/34 (H1N1))]
 MSLLTEVETPIRNEWGCRNGSS**SDPLAIAANIIIGILHLIL**WILDR**LFFKCIYRRFYGLKGGPSTEGVPK**
SMREBYRKEQQSAVDADDGHFVSIELE

SEQ ID NO:14
 >gi|8486130|ref|NP_040982.1| нуклеокапсидный белок [вирус гриппа A (A/Puerto
 Rico/8/34 (H1N1))]
 MASQGITKRSYEQMETDGERQNATEIRASVGKMGIDGIGRFYIQMCTELKLSDYEGRLIQNSLTIERMVLSA
 FDERNNKYLEEHPGAGKDPKKTGGPIYRRVNDGKWMRELVLVDKEEIRRIWRQANNGGDATAGLTHMMIWH
 SNLNDATYQRTALVRTGMDPRMCSLMQGSTLPRRSGAAGAAGVKGITVMVLMELIRMKRGINDRNFWRGE
 NGRKTR**IAYERMCNII**KGK**FQTAAGRMM**VDQVRESRDPNGAEFED**LIFLARSALILRG**S**VAHKS**CLPACV
 YGPAVSSGYDFEKEGYSLVGIDPFKLLQNSQVYSLIRPNENPAHKSQVLVMMACHSAAFEDLRVLSFIRGT
 KVSFPRGKLSIRGVQIASNENMDTMESSTLELRSYWAIRTRSGGNTNQORASAGQISVQPAFVSQRNLFP
 DRITVMAAFTGNTGRTSDMRTEIIRMMESARPEDVSFQGRGVFELSDEKAASPIVPSFSDMSNEGSYFFG
 DNABEYDN
 --

SEQ ID NO:15
 >gi|73912687|ref|YP_308853.1| мембранный белок M2 [вирус гриппа A
 (A/Korea/426/68 (H2N2))]
 MSLLTEVETPIRNEWGCRCDNS**SDPLVVAASIIIGILHFLIL**WILDR**LFFKCIYRFFFKHGLKRGFSTEGVPE**
SMREBYRKEQQSAVDADDGHFVSIELE

SEQ ID NO:16
 >gi|73921307|ref|YP_308871.1| нуклеопротеин [вирус гриппа A
 (A/Korea/426/68 (H2N2))]
 MASQGITKRSYEQMETDGERQNATEIRASVGKMGIDGIGRFYIQMCTELKLSDYEGRLIQNSLTIERMVLSA
 FDERNNKYLEEHPGAGKDPKKTGGPIYRRVNDGKWMRELVLVDKEEIRRIWRQANNGGDATAGLTHMMIWH
 SNLNDATYQRTALVRTGMDPRMCSLMQGSTLPRRSGAAGAAGVKGITVMVLMELIRMKRGINDRNFWRGE
 NGRKTR**SAYERMCNII**KGK**FQTAAGRMM**VDQVRESRNPNGAEIED**LIFLARSALILRG**S**VAHKS**CLPACV
 YGPAIASGYNFEKEGYSLVGIDPFKLLQNSQVYSLIRPNENPAHKSQVLVMMACHSAAFEDLRVLSFIRGT
 KVSFPRGKLSIRGVQIASNENMDTMESSTLELRSYWAIRTRSGGNTNQORASAGQISVQPAFVSQRNLFP
 DKPTIMAAFTGNTGRTSDMRAEII RMMEGAKPEEMSFQGRGVFELSDEKATNPVPSFSDMSNEGSYFFG
 DNABEYDN

SEQ ID NO:17
 >gi|330647|gb|AAA45994.1| pp65 [герпесвирус человека 5]
 MASVLGPISGHWLKAVFSGDTPVLPHETRLQTGIHVRVSPQSLILVSYQTPDSTPCRHQDNQLOVOHT 70
 YFTGSEVENSVNVNHPNCRSICPSQEPMSIYYVALPKMLNIPSNVNHYPSPAERKHRHLPVADAVIH 140
 ASGQKMQAARLTVSCLAWTRQONQWKEPDVYVTSFAFVFTKDVALRHVVAHAELVCSMENTRATKMQVIC 210
 DQYVYVYLESECEDVPSCKLFMHVTLGSDVEEDLTMRNPQPMRPHERNCGTVLCPKNMIIKPKCIHI 280
 MLDVAFTSHEHFCLLCPKSPICLSINLLMNCQIIFLEVQAIKRETVLRQYDVAALFFDIDLLQRC 350
 PQYSEHPFTTSQYRIQCKLEYRHTWDRHDEGAAGQDDVDVWTCSDSDDEELVTTERKTPRVTCGACMACAS 420
 TSAGRKRSASSATACTAGVMTGRGLKAESTVAPEDTDESDNEIHNPAVFTWFPWQAQILARN**LVPMV** 490
ATVQCQNLIKQYEFFWDANDIYRIFAELGCVWQPAAPQKRRRRHQDALPQCIASTPKKHRG 541

SEQ ID NO:18
 >gi|33330937|gb|AAQ10712.1| предполагаемый трансформирующий белок E6
 [папилломавирус человека тип 16]
 MHQKRTAMFQDPQERPKLPQLCTELQTTIHDIILECVYCKQQLLRRE**VYDFAFRDL****LCIVY**RDGNPYAVC 70
 DKCLKFYSKISEYRHYCYSVYGTTLQYQYNKPLCDLLIRCNCQKPLCPKEKQRHLDDKKQRFHNRGRWT 140
 GRMCCRRSSRTRRETQL

SEQ ID NO:19
 >gi|56583270|ref|NP_040979.2| матричный белок 2 [вирус гриппа A (A/Puerto
 Rico/8/34 (H1N1))]
 MSLLTEVETPIRNEWGCRNGSSDPLAIAANIIIGILHLILWILDR**LFFKCIYRRFYGLKGGPSTEGVPK**
SMREBYRKEQQSAVDADDGHFVSIELE

SEQ ID NO:20
 >gi|8486139|ref|NP_040987.1| белок PB2 [вирус гриппа A (A/Puerto
 Rico/8/34 (H1N1))]
 MRRIKELRNLMQSQRTEILTKTTVDHMAIIKKYTSGRQKPNALRMKMMAMKYPITADKRICEMIPER
 NEQQQTLWSKMNDAGSDRVVMVSLAVTWNNRNGPMINTVHYPKIYKTYFERVERLKHGCTGPNVHFNQVK
 IRRRVNDINPGHADLSAKEAQDVIMEVVEPNEVGARILTSESQLTITKEKKEELQDCKISPLMVAYMLERE
 LVKRTFRLPVAGCTSSVYIEVLHLTQGTQWQMTYPGGEVKNDDVDQSLIAARNIVRRAASADPLASL
 LEMCHSTQIGGIRMVLDILKQNPTEQAVGICKAAMGLRISSFSFGGFTFKRTSGSSVKREEEVLGTNLQ
 TLKIRVHEGYEEFTMVGRATAILRKATRLLQLLIVSGRDEQSIAEAIIVAMVFSQEDCMIAVRGDLNF
 VNRANORLNPMLQLLRHFQKDAKVLQNWGVEPIDNVGMGILPDMTPSILEMSMRGVRISKMGVDEYSS
 TERVVVSIDRLVRVDQRGNVLLSPPEVSETQCTEKLITITYSSSSMWELNGPESVLVNTYQWIRNWEIV
 KLOWSONPTMLYNKMEFEPFOSLVPKAIRGOYSFCVRTLFOQMRDVLGTFDTAQIKLLPFAAAPPKQSR
 MQFSSTVNVNRGSGMRLVRCNSPVFNYNKATKRLTVLGKDAGTLTDEPDEGTAGVESAVLRGFLILCKE
 DRRYGPALSINELSNLAKCEKANVLICQGDVVLVMKRKRDSILTDSQATKIRMAIN

```
SEQ ID NO:21
>gi|8486137|ref|NP_040986.1| полимераза PA [ вирус гриппа A (A/Puerto Rico/8/34 (H1N1)) ]
MEDFVRQCFNFMVELAEKTMKEYGEDLKIE2TKFAAICTHLEVCFMYSDFHINEQQGESIIVELGDPNA
LKHKRFEIIEGRDRIMAWTVVNSICNTTGAEPKFLPDLYDYKENRFIEIGVTRREVHIIYLEKANKIKS
EKTHIHIFSFTGEEMAKADYTLDEESRARIKTRLEFTRQEMASRGLWDSFRQSERGOETIEERFEITGC
MRKLADQSLPPNFSSELENFRAYVDGFEPNGY3EGKLSQMSKEVNARI4EPFLKTTTPRLRLPNCPGCCQRS
KFLMDALKLSIEDPSHEGEGIPLYDAIKCMRTFFGWKEPNVVKHEKGINPNYLLSWKQVLAELQDIEN
EEKIPKTKNMKKTSQKWLKGENMAPEKVDFDCCDKDVGDLKQYDSDEPELRSLASWIQNEFNKACELTDS
SWIELDEIGEDVAPIEHIA5SMRRNYFTSEVSHCRATEYIMKGVYINTALLNASCAAMDDFQLIPMISKCR
TREGRRKTNLYGFLIKGRSHLRNDUTVVNFVSMETFSLTDPRLEPHKWEKYCVLEIGDMLLRSAIGQVSRP
MFLYVRINGTSK6KMKWGMEMRRCLQLSLQQ7ESMIEASSVKEKDMTKEFFENKSETWPIGESPKGVVEE
SSIGKVCRTLLAKSVFNSLYASPLQEGFSAESRKL8LLIVQALRDNL9EPGTFDLGGLYEAIEECLINDFWV
LLNASWFNSFLTHALS

SEQ ID NO:22
>gi|8486133|ref|NP_040984.1| неструктурный белок NS1 [ вирус гриппа A (A/Puerto Rico/8/34 (H1N1)) ]
MDPNTVSSFQVDCFLWHVRRKRVADQELCDAPFLDLRLRRDQKSLRGRGSTLGLDIETATRAGKQIVERILK
EESDEALKMTMASVPASRYLTDMTLEEMSR2EWMLPKQKVAGPLCIRMDQAIMDKNII3LKANFSVIFDR
LETLLILRAFTERCAIVCEISPLPSLPCHTAEDVKNACVLLCCLEWNCN4TVRVSETLQRF5AWRRSSNENC
RPPLTPKQKREMAGTIRSEV

SEQ ID NO:23
>gi|8486132|ref|NP_040983.1| неструктурный белок NS2 [ вирус гриппа A (A/Puerto Rico/8/34 (H1N1)) ]
MDPNTVSSFQDILLRMSKMOLESSEDLNGM2IQFESLKLYRDSLGEAVMRMGDLHS3LQNRNEKWRQQLG
QKEFEIRWLIEEVRHKLKVTENSFEQITFMQALHLLLEVEQEIRTF4SFQL5

SEQ ID NO:24
>gi|8486128|ref|NP_040981.1| нейраминидаза [ вирус гриппа A (A/Puerto Rico/8/34 (H1N1)) ]
MNPNQKIITIGSCLVVGLISLILQIGNIIS2WISHSIQTGQNHTGICNQNIITYKNSTVVKDTTSVIL
TGNSSLCPIRGWAIYKSDNSIRIGSKGDVFV3RETFISCSHLECR4FTLTQGALLNDRHNSGTVKDRSPY
RALMSPCVGEAPSPYN5SRFESVAWSASACHDGCWLTIGISGPDNGAVAVLYNGIITETIKSWRRKILR
TQFESACAVNGSCFTIMTDGSPDGLASYKIFKIEKCKVTSIELNAPNSHYEECSY6PDCTKVMVCVRDN
WHGSRNPWFVDQNLQYIGYICSGVFGDNPPKDGTCGCGPVYVDGANGVKCF7SYRYGNGVWIGRTKSH
SSRHGFEIMWPN8GWIE9TSKFSVRQD10VAMT11DWSGYSGSFVQHPELTGLDCIR12PCFVVELIRGRPK13
IWTASSISFICGVNSDTVDWSWPDGAELPFTDK

SEQ ID NO:25
>gi|8486126|ref|NP_040980.1| гемагглютинин [ вирус гриппа A (A/Puerto Rico/8/34 (H1N1)) ]
MKANLLVLLCALAAAD2TICIGYHANNSTD3VDTVLEKNVITVTHSVNLL4EDSHNGKLCRLKCIAPLQLG
KCNIAWGLLGNPECD5FLLPVRSWSYIVETPNS6ENGICYCPGDFIDYEELREQLSSVVS7FERFEIFPK8ESSW
PNHNTTKCVTAACSHACKSSFYRNL9LWLTEKCSYPLKNSYNNKKCEV10LVLCWCIHHPNSNKDQ11NIYQ
NENAYVS12VVTSYNNRRFTE13PIEAERPKYVRDQAGRMNY14YTL15LKPGDTIIFRANGNLIAPRYAFALSRGFGS
GIITSNASHMECNTK16QOTPLGA17INSSLPFCN18HPVTIGECPKYVRSAKLRMV19ICLRNIPSIQSRGLF20GA
AGFIECGWTGMDGWYGH21HQNEQGS22GYAADQKSTQNAINGITN23KVNSVIEKMN24IQF25TAVGKEFNKLEKR
MENLKKVDGDFLDIWTYN26AE27LLVLENER28TLDFHDSNVKNLYEKVSK29LNKNAKEIGNCGCFEY30HKDCN
ECMESVRN31GT32YPKYSEESKLNREKVDGVKLESM33QIYQILAIYSTVASSLVLLVSLG34AISFWMCSNGSL
QCRICI

SEQ ID NO:26
>gi|8486123|ref|NP_040978.1| матричный белок 1 [ вирус гриппа A (A/Puerto Rico/8/34 (H1N1)) ]
MSLLTEVEYTVLSIIPSGPLKAEIAQRLE2VFAGKNTDLEVLMEWMLKTRP3LSPLTKGILG4VF5TLTVPS
ERGLQRRRFVQNALNCNGDPNNMDKAVKLYRKLKREIT6FHGAKEISLSYAGALASCMGLIYNRMGA7VT
EVAFLVCATCEQIADSQHRSHRQMVT8TNPLIRHENRMV9LASTTAKAMEQMACSSEQAAEAMNEVASQAR

QMVMQAMRTIGTHPSSSAGLKNDLLENLQAYQKRMGVQMQRK

SEQ ID NO:27
>gi|83031685|ref|YP_418248.1| белок PB1-F2 [ вирус гриппа A (A/Puerto Rico/8/34 (H1N1)) ]
MQQEQTTPWILSTGHISTGQKRD2CGQTPKLEHRNSTRLMGHCQKTMNQVVM3PKQIVYWKQWLSLRNPILV
FLKTRVLKRWRLSKHE

SEQ ID NO:28
>gi|8486135|ref|NP_040985.1| полимераза 1 [ вирус гриппа A (A/Puerto Rico/8/34 (H1N1)) ]
MDVNP2TLLFLKVPAQNAISTTFPYTGDPPYSHGTGTGYTMDTVNR3THQYSEKARWTTNTETGAPQLNPID
GFLPEDNEP4SGYATDCVLEAMAFLEESH5PGIFENS6CIETMEVVQOTVRD7KL8TGGRQTYD9WTLNRNQ10PAA
TALANTIEVFRNSGLTANESGR11LIDFLKDV12MESMKKEEMGIT13THFQKRRVRDNMTKKMIT14QRTICKR15Q
RLNKRSLYRALRLTNMTKDAERGLKRR16AIATPSMQIRG17VYFVETLARSICEKLEQSGSLPVG18GNEKKA
KLANVVRKMTNSDTELSLTIT19GDNTKWNENQ20NRFLAMIT21YMRNOPEWFRNVLSIAPIMFS22NKMAR
LKG23YMFESKSMKLR24QIPAEMLASIDLKYFNDSTRKKIEKIRPL25IEGTASLPGMMMGFMNLS26TVLG
VSILNLQKRYTK27TYWWDGLQSSDDFALIVNAPNH28EGIQAGVDRFYRTCKLHG29INMSKKKSYINRTGTG
EFTSFFYRYGVANFSMELPSFGVSGSNESADMSIGTVIKNNMINNDLGPATAQMALQ30LFIDKYRYTYR
CHRGDTQIGTRRSFEIKKLWEQTRSKAGLLVSDGGPNLYNIRNLHIPEVCLKWE31LMDEYDQGRLCNPLNP
FVSHKEIESMNNVAMMPAHGPAKNMEYDAVAT32THSWIPKRNRSILNTSQRGVLEDEQMYQRCCNLFEKFF
PSSSYRRPVGISSMVEAMVSRRARIDARIDFESGR33IKKEEFTIMKICSTIEELRRQK

SEQ ID NO:29
>gi|8486130|ref|NP_040982.1| нуклеокапсидный белок [ вирус гриппа A (A/Puerto Rico/8/34 (H1N1)) ]
MASQCTKRSYEQMETDCERQ2NATEIRASVCKMICCICORFYIQMCTELKLS3DEYECRLQNSLTIERMVLSA
FERRRNKYLEEHP4SAGKDPKKTGCPYRRVNGKMWRELIYDKEEIRRIWRQANN5GGD6ATAGLTHMIHW
SNLNDATYQRTALVRTGMDPRMCSLMQGSTLP7RRSGAAGA8AVKGVGTMVRLMVRMIKRGINDRNFWRGE
NGRKTRIA9YERMCNILK10GKFQTAQKAMMDQVRESRDPGNAEFDLTFLARSALILRGSV11AHKSCLPACV
YGP12AVASGYDFERE13GYSLVGLD14PLRLLQNSQVYLSRLPNENPAHKSQLVN15MACHSAAE16EDL17RVLS18IKGT
KVVPRGKLSTRGVQIASNENMETMES19SILELRSRYAIRTRSGGNTNQ20QASAGQISIQPTFSVQRNLPF
DRTIVMAAFTENTEGRTSDMRTEIIRMMESARPEDVSFQGRGVFELSDEKAASPIVPS21DMSNEGSYFFG
DNAEAYDN

SEQ ID NO:30
>gi|73918826|ref|YP_308855.1| полимераза 2 [ вирус гриппа A (A/Korea/426/1968 (H2N2)) ]
MERIKELRNLMSQSKIREILTKTIVD2HMAIKKYISGRQEKNP3SLRMKWMAMKYPITADKRIT4EMVPER
NEQQGT5LWSKMSDAGSDRVVMVSLAVTWWNRNGPMISIVHYPKIYKTYFEKVERLKHGTFGPVHF6RNQVK
IRRRVDINPGHADLSAKEAQDVIMEVVEV7PNWEGARLLESQ8LITTEKKEEELQDCKISPLMVAIMLERE
LVKRIRELEVAGCSTSVYIEVLHLTQCICW9QMT10PCSGVRNDVDQSLILAA11RNLVRAAVSADPLASL
LEKCHSTQICGCTRMVDIL12QNPTEQAVDILCAAMGLAIS13SPSGCF14FFKRTSGSSIKKEEVLTCILQ
TLKIRVHCYEFE15TMVCKRATAILRKATRLVQLIVSGRDEQSI16AZAIIVAMVFSQEDCMIKAVRGDINE
VNRANQRNLNPMHQLLRHFKDAKVLQNWGIEHIDNVCMIGVLD17DMTPSTMESMRGIRVSKMCDVEYSS
TERVVYSIDRF18LRVRDORGNVLLSP19EEVSETOCTEKLIT20YSSMMWEINGPESVLN21TYOWIIRIWETV
KIQWSQNP22TMLYNKMEFEPQSLVPKALRGQYSGFVRTLPQMRDVLCT23DTTQILKPLFAAAPPKQSR
MQFSSLTVMRSGCMRILVRGNSPVENYKTK24TRLLTILCKDACTLTEDPDEGTSQVSAVLRGLFLLCKE
DRRYCPALGINELSTLAKGEKANVLIGQSDVVLVMKRRKDD25SILTDSQAT26KIRMAIN

SEQ ID NO:31
>gi|73919145|ref|YP_308850.1| гемагглютинин [ вирус гриппа A (A/Korea/426/68 (H2N2)) ]
MAIYILLLFTAVRGDQICIGYHANNSTEKVD2TILERNVTVTHAKDILEKTHNGKLC3KLNGIPPLELGDG
STAGWLLGNPECDRLLSVP4EWYSIMEKENPRYSLCYPGSFNDYEELK5HLSSVKHFEKVKILPKDRWTQH
TTTGCSWACAVSGKPSFFRNMVWLTRKCSNYVPAKGSYNNITSCEQMLIIWGVH6HNDEAEQ7RALYQNVGT
```

034031

YVSVATSTLYKRSIPEIAARPKVNLGRMEFSWTLDDWDTINFESTGNLVAPEYGFKISKRGSSGIMK
TEGTLNCEATKCQTPLGAIINTTLPFHNHPLTIGECPKYVKSEKVLATGLRNVQPQIESRGLFGAIGAFI
EGGWQCMVDGWYGYHHSNDQSGSYAADKESTQKAFNGITNKVNSVIEKMNTQFEAVGKEFSNLEKRLLENL
NKKMEDGFLDWYTYNAELLVLMENERTLDFHDSNVKNLYDKVRMQLRDNVKELNGCGFEFYHKCDNECMD
SVKNGTYDPKYEEESKLRNREIKGVKLSMGMVYQILAIYATVAGSLSLAIMMAGISFWMCSNGSLQCRI
CI

SEQ ID NO:32
>gi|73912688|ref|YP_308854.1| мембранный белок M1 [вирус гриппа A
(A/Korea/426/68 (H2N2))]
MSLLTEVETYVLSIVPSGPKAEIAQRLEDVFAGKNTDLEALMEWLKTRPILSPLTKGILGFVFTLTVP
ERGLQRRRFVQNALNCGNDPNMMDRAVKLYRKLKREITFHGAKEVALSYSAGALASCMCLIYNRMCAVIT
EVAFVAVCATCEQIADSQHRSHRQMTVTNPLRHNRMVLASTTAKAMEQMACSGSEQAAEAMEVASQAR
QMVAAMRAICTPPSSSAGLKDDLLENLQAYQKRMGVQMQRFK

SEQ ID NO:33
>gi|73912687|ref|YP_308853.1| мембранный белок M2 [вирус гриппа A
(A/Korea/426/68 (H2N2))]
MSLLTEVETPIRNEWGRCNDDSDPLVVAASIIGILHFLILWLDLRFKCIYRFFKHGLKRGPSLEGVPE
SMREYRKREQQSAVDADDSHFVSELE

SEQ ID NO:34
>gi|73912685|ref|YP_308852.1| полимераза PA [вирус гриппа A
(A/Korea/426/68 (H2N2))]
MEDEVRCQNPIMIVELAEKAMKEYGEDLKIEFNKFAAICTHLEVCFMYSDFHINEQGCSIMVELDDPNA
LLKHREFIEGRDRTMANTVNSICNTTCAEKPKFLPDLYDYKENRFIEIGVTRREVHIYYLEKANKIKS
ENTHIHIFSTCEMATKADYTLDEESRAIKTRLFTIRQEMANRGLWDSFRQSERGEETIEERFEITCT
MRRLADQSLPPNFSCLENFRAYVDCFEPNGYIECKLSQMSKEVNAKIEPFLKTTTPRPIRLPDGPPCFQRS
KFLMLDALKLSIEDPSHEGEGIPLYDAIKCMRTFFGNKEPYIVKPHKEGINPNYLLSWQVLAELQDIEN
EEKIPRTKNMKKTSQKLWALGNMAPEKVDNDCRDISDLKQYDSDEPELRLSSWIQNEFNKACELTDS
IWIELDEIGEDVAPIEHIASMRNRYFTAEVSHCRATEYIMKGVYINTALLNASCAAMDDFOLIPIMSKCR
TKEGRRKTNLYGFIKKRSHLRNDTDVNVFVSMEFSLTDRLEPHKWEKYCVLEIGDMLLSAIGQMSRP
MFLYVRTNGTSKIKMKWGMEMRPCLQSLQQIESMVEAESSVKEKDMTEFFENKSETWPIGESPKGVEE
CSIGKVCRTLAKSVFNSLYASPLQEGFSAESRKLLLVQALRDNLEPGTFLDGLGYEAIIECLINDPVV
LLNASWFNSFLTHALR

SEQ ID NO:35
>gi|73921833|ref|YP_308877.1| белок PB1-F2 [вирус гриппа A
(A/Korea/426/68 (H2N2))]
MCQEQDTPWTQSTEHINIKQKRGSCQQTARKLERPNLTQLMDHYLRTMNVQMDMKQTASWKQLSLRNHTQE
SLKIRVLKRWKLFNKKQEWTN

SEQ ID NO:36
>gi|73912683|ref|YP_308851.1| субъединица полимеразы PB1 [вирус гриппа A
(A/Korea/426/68 (H2N2))]
MDVNPITLLFLKVPQAQNAISTTFPYTGDPFYPYSHGTCTGYTMDTVNRTHQYSEKGKWTNTTETGAPQLNPID
GPLPEDNEPSGYAQTDVLEAMAFLEESHPIGFENSCLEMTMEVIQOTRVDKLTQGRQTYDWTLNRNQPA
TALANTIEVFNRNGLTANESGRLLIDFLKDVIESMDKEEMEITTFHQRRKRRVRDNMTKMMVTQRTICGKKQ
RLNKRSYLIRALTINTMTKDAERCKLKRRAIATPGMQIRGFVHFVETLARNICEKLEQSGLPVGGNEKKA
KLANVVRMMTNSQDTELSFTITGDNTKWNENQNPVRFLAMITYITRNQPEWFRNVLSIAPIMFSNKMAR
LGKGYMESKSMKLRQIPAEMLASIDLKYFNESRKKIEKIRPLLIDGTVSLSPGCMGCMFNMLSTVLG
VSLNLNGQKKYTKTYWWDLQSSDDFALIVNAPNHEGIAQGVNRFYRTCKLVGNMSKKKSYINRTGTG
EFTSFFYRYCFVANFSMELPSFGVSGINESADMSIGVTIVKNNMINNDLGPATAQMALQLFIDKYRYTYR
CHRGDTQITQRSSFLEKLLWEQTRSKAGLLVSDGGSNLYINRNLHIEPVCLKWELMDEYQGRLCNPLNP
FVSHKEIESVNNAVMPAHPAKSMEDYDAVATTHSWTPKRRNSILNTSQRGLEDEQMYQKCNLFKEKF
PSSSYRRPVGISSMVEAMVSRARIDARIDFESGRKKKEEFAIMKICSTIEELRQK

SEQ ID NO:37
>gi|73921567|ref|YP_308869.1| неструктурный белок NS2 [вирус гриппа A
(A/Korea/426/68 (H2N2))]
MDSNTVSSFQDILLRMSKMQLGSSSEDLNCGMITQFESLKIYRDSLGEAVMRMGDLHSLQNRNGKWREQLG
QKFEFIRWLIIEVVRHLKITENSEEQITFMQALQLLFEVEQEIRTFSFQLI

SEQ ID NO:38
>gi|73921566|ref|YP_308870.1| неструктурный белок NS1 [вирус гриппа A
(A/Korea/426/68 (H2N2))]
MDSNTVSSFQVDCFLWHVRRQVVDQELGDAPFLDRLRRDQKSLRGRGSTLDLDEAATVGVGKQIVERILK
EESDEALKMTMASAPASRYLTDMTIEELSRDWFMLMPKQKVEGPLCIRIDQAIMDRNIMLKANFSVIFDR
LETILLRAFTTEGALVGEISPLPSLPGHTIEDVKNAIGVLIGGLEWNDNTVRVSKTLQRFAWRSSNENG
RPFLTPKQKKRMARTRSKVRDRKMD

SEQ ID NO:39
>gi|73921307|ref|YP_308871.1| нуклеопротеин [вирус гриппа A
(A/Korea/426/68 (H2N2))]
MASQTKRSYEQMTEGCEQONATEIRASVCKMIDICGRFYQMCTELKLSDYEGRLIQNSLTIERMVLSA
FDERNRKYLEEHSACKDPKTCGPPIYKRVDCKNMRELVLDYKEEIRRIWROANNCDDATAGLTHMMIWH
SNLNDTTYQTRALVKTGMDPRMCSLMQSGTLPRRSACAAGAVKCVGTMMELIRMTKRGINDRNFWRGE
NGRKTRSAYERMNIIKCKFTQAARAMMDQVRESRNPCHAEIEDLILARSALILRCSVAHKGLCLPACV
YGEFALASYNEKEGCVSLVGDIPFKLLONSQVYSLIRPNENPAHSQVLYMACNSAAFEIDLVLVSFIRGT
KVSPRKGLSTRGVQIASNENMDTMESSTLELSRYWALIRTRSCGNTINQQRASAGQISVQPAFSVQRNLPF
DKETIMAAFTGNTGRTSDMRAEIIIRMEGAKPEEMSPQGRGVFELSDDEKATNPVPSFDMSNDCSYFFG
DNAEEYDN

SEQ ID NO:40
>gi|73921304|ref|YP_308872.1| нейраминидаза [вирус гриппа A
(A/Korea/426/68 (H2N2))]
MNFNQKIITIGSVSLTATVCFLMQIAILVTTVTLHFQHECDSPASNQVMPCEPIIERNNITEIVYLN
TTIEKEICEPVVEYRNWSKPCQICTFAPFSKDNSIRLSACGDIWVTREPVSVDGPKCYQFALQGQTTL
DNKHSNDTIHDRIPHRTLMLNELGVFFHLGTRQVCVAVWSSSSCHDGKAWLHVCVTGDDKNATASFYDGR
LMCSIGSWSQNILRTQESRCVCINGCTVVMTDGSAAGRADTRILFIEGKIVHISPLSGSAQHVEECSC
YPRYPDVRCICRDNWKSNNRPVIDINMEDYSIDSSYVCSGLVGDTPRNDRRSSNSNCRNPNNGRGNPGVK
GWAFDNGDDVMMGRTSKDLRSGETFKVIGGWSTPNKSGINRQIVDSNNWSSGYSGIFSVECKRCINR
CFYVELIRGRQQETRVVWTSNSIYVFCGTSCTGYTGSWFDGANINFMP

SEQ ID NO:41
>gi|73919213|ref|YP_308844.1| неструктурный белок 2 [вирус гриппа A
(A/New York/392/2004 (H3N2))]
MDSNTVSSFQDILLRMSKMQLGSSSEDLNCGMITQFESLKIYRDSLGEAVMRMGDLHLLQNRNGKWREQLG
QKFEFIRWLIIEVVRHLKTTENSEEQITFMQALQLLFEVEQEIRTFSFQLI

SEQ ID NO:42
>gi|73919212|ref|YP_308845.1| неструктурный белок 1 [вирус гриппа A
(A/New York/392/2004 (H3N2))]
MDSNTVSSFQVDCFLWHIRKQVVDQELSDAPFLDRLRRDQKSLRGRGNTGLDLKAAITHVGKQIVEKILK
EESDEALKMTVSTPASRYITDMTIEELSRNWFMLMPKQKVEGPLCIRMDQAIMKNIIMLKANFSVIFDR
LETIVLLRAFTTEGALVGEISPLPSLPGHTIEDVKNAIGVLIGGLEWNDNTVRVSKNLQRFAWRSSNENG
GPFLTPKQKKRMARTARSKV

SEQ ID NO:43
>gi|73919207|ref|YP_308839.1| гемагглютинин [вирус гриппа A (A/New York/392/2004 (H3N2))]
MKTILALSYILCLVFAQKLPGDNMSTATLCLCHHAVPNGTIVKTTINDQIEVTNATELVQSSSTGGICDS
PHQILDGENTCILDALLCDPQCDGFQNKWDLFVERSKAYSNCPYDVPDYASLRSLVASSGTLEFNNES
FNWTCVTQNGTSSACKRRSSNFFSRNLNLWTLHLEKYKYPALNVTMPNNEFKDKLYIGWVHPGTDNDQISL
YAQASGRITVTKRSQQTVIPISICSRPRI RDVPSRISIIYWTIVKPCDILLINSTGNLIPRCYFKIRSCK
SSIMRSADAPIGKCNSECITPNGSIPNDKFPQNVNRITYGACPRYVKQNTLKLATGMNRNPEKQTRGIFGA

IAGFIENGWEGMVDGWYGRHQNSEGTTGQAADLKSTQAA~NQINGKLNRLICKTNEKFHQIEKEFSEVEGR
 RIQDLEKYVEDTKIDLWSYNAELLVALENQHTIDLTDSEMNKLEFERTKQKRENAEDMGNCCKIYHKCD
 NACIGSIRNGTYDHDVYRDEALNNRFQIKGVELKSGYKDWLWISFAISCFLLCVALLGFIWMAQCQKNGI
 RCNICI

SEQ ID NO:44
 >gi|739:9153|ref|YP_308840.1| матричный белок 2 [вирус гриппа A (A/New
 York/392/2004 (H3N2))]
 MSLLTEVETPIRNEWGCRCDNDSSDPLVVAASIIGILHLILWILDRLEFKCVYRLFKHGLKRGPTGCVPE
 SMREEYRKEQQNAVDADDSHFVSIELE

SEQ ID NO:45
 >gi|739:9152|ref|YP_308841.1| матричный белок 1 [вирус гриппа A (A/New
 York/392/2004 (H3N2))]
 MSLLTEVETVLSIVPSGPKLAEIAQRLEDVFAKNTDLEALMEWLKTRPILSPLTKGILGCVFTLTVP
 ERGLQRRRFVQNALNGCDPNMDKAVKLYRKLRKREITFHGAKEIALSYSAGALASCMGLIYNRMGAVTT
 EVAFLVCATCEQIADSQHRSHRQMVATINPLIKHENRMVLASTTAKAMEQACSGSQAEEAMEIASQAR
 QMVQAMRAVGTHPSSSTGLRDDLLENLQTYQKRMGVQMQRFK

SEQ ID NO:46
 >gi|739:9150|ref|YP_308848.1| белок PB1-F2 [вирус гриппа A (A/New
 York/392/2004 (H3N2))]
 MEQEQUITWTQSTEHNTIQRGSGRQIQKLGHPNSTQLMDHYLRIMSQVDMHKQTVSWRLWPSLKNPTQV
 SLRTHALKQWKSEFNKQWIN

SEQ ID NO:47
 >gi|739:9149|ref|YP_308847.1| полимераза PB1 [вирус гриппа A (A/New
 York/392/2004 (H3N2))]
 MDVNPTLFLFKVPAQNAISTFFPYTCDPPYSHGTGCTGTYMDTVNRTHQYSEKKGWTTNTETGAPQLNPID
 GPLPEDNEPFSYAQIDCVLEAMAFLEESHGPIFENSCLTEMEVVQQTRVVKLTQGRQTYDWTILNRNQPA
 TALANTIEVFRSNGLTANESGRILDFLKDVMEISMDKEEMETTHFQRRRVRDMMTKMVTQRTIGKKKQ
 RVNKKCYLRALILMTMTKDAERKGLKRAIATPCMQIRGFVYFVETLARSICEKLEQSGLPVGGNEKKA
 KLANVVRKMTINSQDTLESTIICDNTKWNENQNPMELAMITVYITKNQPEWFRNLISIAFLME SNKMAR
 LSGCYMESKRMKRLTQIDAEMLAASLDKYENESTRKKIEKIRDLLIDCTASLSPCMMKGMNMLSTVLG
 VSVLAILGCKKYTKTTFYWDGLQSSDDALVNAPNHKEIQACVDREYKTCIKLVEINMSKKKSYINKTGTF
 EFTSEFYRKGCVANESMELPFGVSGSINESADMSICVTVKNNINNDLCPATAQMALQLEIKDYRYTYR
 CHRQDTQCTGRSFELKKLWQDTQSRAGLLVSDCCPNLYINRLHIPEVCLKWELMDENYRCRLCNPLNP
 FVSHKEIESVNAVMPAHCPAKSMEDYDAVATTHSWNPKRNSILNTSQRCILEDEQMYQKCNLFKEKFF
 PSSSYRRPICISSMVMEAMVSRARIDARIDFESGRIKKEEFSEIMKICSTIEELRRQK

SEQ ID NO:48
 >gi|739:9147|ref|YP_308843.1| нуклеокапсидный белок [вирус гриппа A
 (A/New York/392/2004 (H3N2))]
 MASQCTKRSYEQMETDGRQNAETIRASVGMIDGICRFYIQMCTELKLSHDEGRILQNSLTIEKMVLSA
 FDERRNKYLEEHPISACKDPKKTGCPYRRVDCKWMRELVLVDKEEIRRIWRQANNCEATAGLTHIMWH
 SNLNDATYQRTALVRTGMDPRMCSLMQCSTLPRRSACAAGAAVKIGTVMVMEILRMVKRGINDRNFWRCE
 NGRKTSAYERMCNILKKGFTAAQRAMVDQVRESRNPENAEIEDLIFLARSALILRGSAVHKSCFLPACA
 YGPAVSSGYDEKEGYSVLGIDPFKLLQNSQIYSLIRPNENPAHKSQLVWMACHSAFAEDRLRLSFIKGT
 KVSPRGKLSTRGVQIASNENMDNMGSSTLELRSGYWAIRCSGNTNQORASAGTQSVQPTFSVQRNLPF
 EKSTIMAAFTGNTGRTSDMRAEILRMMECAKPEEVFRCRGVFEISDEKATNPVPSFDMSENGSYFFG
 DNAEEYDN

SEQ ID NO:49
 >gi|739:9136|ref|YP_308842.1| нейраминидаза [вирус гриппа A (A/New
 York/392/2004 (H3N2))]
 MNPNQKI~TIGSVSLTISTICFFMQIAILITVTLHFQYEFNSPPNNQVMLECEPTIERNITIEIVYLTN
 TTIEKEMCPKLAEYRNWSKQCDITGFAPFSKDNSIRLSAGGDIWVIREPYVSCDPDKCYQFALQGOTTL
 NNVHSND~VHDRTPYRTLMMNELGVPEHLGTQKQVCIWSSSSCHDCKAWLHVCVTGDDKNATASFYNGR
 LVDSIVSWSKKILRTQSECEVCINGTCTVMVTDGSAASKADTKILFIECKIHTSTLSCGSAQHVEECSC

YPRYPGVRCVCRDNWKGSNRPIDINIKDYSIVSSYVCSGLVGDTPRKNDSSSSSHCLDPNNEEGCHGVK
 GWAFDDGNDVWMGRITISEKLRSGETFKVIEGWSKPNKSLQ~NRQVIVDRGNRSYSGICFISVEGKSCINR
 CFYVELIRGKKEETEVLWTSNSIVVFCGTSYGTIGSWPDGADINLMPI

SEQ ID NO:50
 >gi|73919134|ref|YP_308846.1| полимераза PA [вирус гриппа A (A/New
 York/392/2004 (H3N2))]
 MRDEFVQCEPNMIVELAEMAKMEYCEDLKIEITNKFAAICTHLEVCFMYSDFHIEQCEGSIVVELDPNAL
 LKHRRFEIIEGRDRTMATVNVNSICNTIGAEKPKFLPDLYDYKENRFIEIGVTRREHVHYLEKANKIKS
 ENCHIHIFSFETGSEIATKADYTLDEESRAR~KTRLFTRQEMANRGLWDSFRQSEGEETIEEKFIEISG
 MRRLLADSLPPKFSCLENFRAYVDGFEPNGCIEGLSOMSKEVNAKIEPFLKTTTPRPILKPNGPFCYORS
 KFLMLDAKLSIEDPSHEGCEIPLYDAIKC~KTFGWKEPY~VKPHEKGSINNYLLSWKQVLSLQDIE
 EEKIPRTKNMKKTSQKQWALGENMAPEKVDFDNCRDISDLKQYDSDEPELRSLSWWIQNEFNKACELTDS
 IW~ELDEIGEDVAPIEYIASMRNRYFTAESVSHCRATEYIMKGQVINTALLNASCAAMDDQLIPMISKCR
 TKEGRKRNTLYGFIIGKRSHLRNDTDVNVFVSMFEFLTDPRLEPHKWEKVCYLEIGDMLLSAIGQISRP
 MFLYVIRNTGTSKVMKWGMEMRRCLLQSLQQIESMIEAESSE~KEKDMTEKFFENKSEAWPIGESPKGVVE
 GS~GKVCRTLLAKSVFNSLYASPOLGEGFAESRKLLLVVQALRDNLNLEPGTFDLGGLYEALIEECLINDFWV
 LLNASWFNSFLTHALK

SEQ ID NO:51
 >gi|73919060|ref|YP_308849.1| полимераза PB2 [вирус гриппа A (A/New
 York/392/2004 (H3N2))]
 MSRIKELRNLMSSQSTREILIKTTVDHMAI~KKYTSGRQEKNPRLMKWMMAMKYPITADKRITEMVPER
 NEQQOTLNRMSDAGSDRVVPSPLAVTWWNRN~VASTVHHDPVKYTYEDKVERLKHGTFGPVHFRNVRK
 IARRVIDNPGCHADLSAKEAQDIMEVVEFNPVEYCAKILTSBSOLITTKKEKKEELRDCILPLMVAYNMLERE
 LVKTRLEPLVAGGTSIIYIEVLHLTQCTCWEQMYTPCGEVRNDDVDGSLIIAARNIVRAAVSADPLASL
 LEMCHSTQICCTMMVDILRQNPTEQAVDICKAAMGLRISSSE~SFCCTFKRTSGSSVKKEEVLITGNLQ
 TLKIRVHCEYEEFTMVCKRAITAILRKATRLVLQIVSCRDEQSIAEALIVAMVFSQEDCMIKAVRGDNLN
 VNRAQRNLNLEPMHQLLRHFQKDAKVLFCQWNC~EHIDSVCMGVCLPDMTPSTEMSMRGIRVSKMCGVLEYSS
 TERVVVSIDRELRVRDGRCNVLLSPPEEVSE~QCTERLMTITYSSMMWEINGPESVLNRTYQWIRNWEAV
 KIOWSQNPAMLYNKMFEFPGQLVPAKAI~RSQYSGFVRTLEQOMRDVLGTFDTTQIIKLEFFAAAPFKQSR
 MQFSSSLTVNVRGSGMRILVRGNSPVFNYNKT~TKRLTILGKDAGTILEDPEDESTSGVESAVLRGFLIICKE
 DRRYGPALSNELSNLAKGEKANVLICQGDVVLVVMKRRKRDSSILTDSQTATKRIIRMAIN

SEQ ID NO:52: CMV Protein IE122:
 >gi|39841910|gb|AAR31478.1| UL122 [герпесвирус человека 5]
 MESSAKRKMDPDNPDEGPSSKVPREPVTIKATTFLQITMLRKEVNSQLSLGDPFLFELAEESLKTFEQVT
 EDCENEPKEDVLAELGDILAQAVNHAGIDSSSTGHITLTHSCSVSSAPLNKPTPTSVAVTNTPLFGASAT
 PELSPRRKKPRKTIIRPFKVIIKFPVPFAPIMLPLIKOEDIKPEPDTIQYRNKIIDTAGCIVISDSEEEQG
 EEVETRGATASFSFGSGTFRVTSPTHPLSQMNHPFLPDLARPDEDSSSSSSSCSGSAADSESESEEMK
 CSSGGGASVTSHHHGGGFGSAASSSLLSCGHQSSGGASIGPRKKKSRISELDNEKVRNIMKDKNIPCTPINVOTRRG
 RVKIDEVSRMFRNTNRSLEYKNLFPITFPMHQVLDEAIIKACTKTQVNNKIGQIIYITRNHEVKSEVDAYRCGLGIMCNLA
 LSTPFLMEHTMPVTHPEVAORTADACNEGVKAWSKELHTHOLCFRSSSDYRNMIIRATFVDLLGALNLCPLMKP
 FQVMVRIFSTHQGGFLPIYETAAKAYAVGQFEQPTETFPEDLTLSLAEAAIQLRNKSQ

SEQ ID NO:53:
 >gi|4927721|gb|AAD33253.1|AF125673_2_E7 [папилломавирус человека тип 16:
 MHGDTPTLHEYMLLDQPETTTLQCYEGLNDSSSEEDIDGPAAGQAEPRKAHYNIVTFCCKCDSTLRLCVQ
 STHVDIRTLLEDLL~GTLGIVCPICSGQKP

Пример 1.

Пептиды по настоящему изобретению можно синтезировать в Schafer-N в виде C-концевых амидов с использованием Fmoc-химии, как описано Sheppard, 1978, J. Chem. Soc, Chem. Commun., 539.

Тест оценки проникновения в клетки.

Ряд пептидов биотинилировали по N-концу и добавляли различные комбинации аминокислот, в от-

ношении длины и типа, к последовательности блоков X^1 , X^2 , X^3 , X^4 , X^5 и X^6 в пептидах, как показано на диаграмме ниже. Пептиды тестировали по их влиянию на клетки, отобранные от одного отдельного донора крови.

Схематическая диаграмма аминокислотной последовательности пептидов по изобретению (каждый X определяет последовательность аминокислот)

X^1	X^2	X^3	X^4	X^5	X^6
-------	-------	-------	-------	-------	-------

Внутриклеточное окрашивание на биотинилированные пептиды.

96-луночные полистироловые планшеты с U-образным дном (NUNC, номер по каталогу 163320) используют для окрашивания человеческих PBMC. Вкратце, биотинилированные по N- или C-концу пептиды, приведенные в табл. 1 (т.е. тестировали 5, 2,5 и 1,25 мМ для каждого пептида) инкубируют при 37°C в течение 2 ч с 40 мкл PBMC ($12,5 \times 10^6$ клеток/мл) от доноров крови. Затем клетки отмывают 3×150 мкл Cellwash (BD, номер по каталогу 349524) с последующим ресуспензированием каждого клеточного осадка в 100 мкл смеси трипсин-ЭДТА (Sigma, номер по каталогу T4424), затем инкубируют при 37°C в течение 5 мин. Затем трипсинизированные клетки промывают 3×150 мкл Cellwash (BD, номер по каталогу 349524) с последующим ресуспензированием BD Cytofix/Cytoperm™ plus (BD, номер по каталогу 554715), затем инкубируют при 4°C в течение 20 мин согласно указаниям изготовителя. Затем клетки отмывают 2×150 мкл PermWash (BD, номер по каталогу 554715). Затем клетки окрашивают стрептавидином-APC (BD, номер по каталогу 554067) и анти-hCD11c (eBioscience, номер по каталогу 12-0116) согласно инструкциям изготовителя при 4°C в течение 30 мин с целью визуализации соответственно биотинилированных пептидов и дендритных клеток. Затем клетки отмывают 3×150 мкл PermWash с последующим ресуспензированием в буфере для окрашивания (BD, номер по каталогу 554656) перед анализом проточной цитометрией. Дендритные клетки гейтируют в виде CD11c⁺ событий вне области лимфоцитов (например, сигналы FSC&SSC выше, чем лимфоцитов). Общее количество клеток 200000 регистрируют на проточном цитометре FACSCanto II с нагрузкой HTS, и получают гистограммы для общего количества клеток и дендритных клеток в отношении флуоресценции пептидов (т.е. GeoMean).

Внеклеточное окрашивание на биотинилированные пептиды.

96-луночные полистироловые планшеты с U-образным дном (NUNC, номер по каталогу 163320) используют для окрашивания человеческих PBMC. Вкратце, 8 мкл биотинилированных по N- или C-концу пептидов, приведенных в табл. 1 (т.е. тестировали 5, 2,5 и 1,25 мМ для каждого пептида; все пептиды производства Schaefer) инкубируют при 37°C в течение 2 ч с 40 мкл PBMC ($12,5 \times 10^6$ клеток/мл) от доноров крови. Затем клетки отмывают 3×150 мкл Cellwash (BD, номер по каталогу 349524), затем окрашивают стрептавидином-APC (BD, номер по каталогу 554067) и анти-hCD11c (eBioscience, номер по каталогу 12-0116) согласно инструкциям изготовителя при 4°C в течение 30 мин с целью визуализации соответственно биотинилированных пептидов и дендритных клеток. Затем клетки отмывают 3×150 мкл Cellwash (BD, номер по каталогу 349524) с последующим ресуспензированием в буфере для окрашивания (BD, номер по каталогу 554656) перед анализом проточной цитометрией. Дендритные клетки гейтируют в виде CD11c⁺ событий вне области лимфоцитов (например, сигналы FSC&SSC выше, чем лимфоцитов). Общее количество клеток 200000 регистрируют на проточном цитометре FACSCanto II с нагрузкой HTS, и получают гистограммы для общего количества клеток и дендритных клеток в отношении флуоресценции пептидов (т.е. GeoMean).

Затем можно детектировать, если пептид обладает способностью поступать в клетку.

Пример 2. Положительный CTL-ответ можно анализировать тестом ELISPOT.

Ответ IFN-гамма цитотоксических Т-клеток (CTL) с использованием теста ELISPOT.

Вкратце, на сутки 1 образцы PBMC от пациентов с HCV инкубируют в колбах (430000 PBMC/см²) в течение 2 ч при 37°C в атмосфере 5% CO₂ в покрывающем количестве культуральной среды (RPMI 1640 Fisher Scientific; номер по каталогу PAAE15-039 с добавлением L-глутамина) (MedProbe номер по каталогу 13E17-605E, 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS), Fisher Scientific, номер по каталогу A15-101) и смеси пенициллин/стрептомицин (Fisher Scientific, номер по каталогу P11-010) для обеспечения адгезии моноцитов. Неприкрепившиеся клетки отделяют, промывают и замораживают в 10% об./об. ДМСО в FBS до дальнейшего использования. Прикрепившиеся клетки тщательно промывают культуральной средой с последующей инкубацией при 37°C до суток 3 в культуральной среде, содержащей 2 мкг/мл в конечной концентрации hrGM-CSF (Xiamen amoytop biotech co, номер по каталогу 3004.9090.90) и 1 мкг/мл hrIL-4 (Invitrogen, номер по каталогу PHC0043), и затем данную процедуру повторяют на сутки 6. На сутки 7 культивированные дендритные клетки (5000-10000 на лунку) добавляют в планшеты ELISPOT (Millipore multiscreen HTS), покрытые антителами к человеческому γ -интерферону вместе с оттаявшими аутологичными неприкрепившимися клетками (200000 на лунку), образцами антигена (конечная концентрация 1-8 мкг/мл для пептидных антигенов; конечная концентрация конканавалина А 5 мкг/мл (Sigma, номер по каталогу C7275) или РНА (Sigma, номер по каталогу L2769) и антителами против анэргии (конечная концентрация 0,03-0,05 мкг/мл для анти-PD-1 (eBioscience, номер по каталогу 16-9989-82) и анти-PD-11 (eBioscience, номер по каталогу 16-5983-82)). Планшеты инкубировали в течение ночи, и пятна

развивали согласно инструкциям изготовителя. Пятна анализировали на ридере ELISPOT (CTL-ImmunoSpot® S5 UV Analyzer).

Пример 3. Система REVEAL&ProVE® быстрого обнаружения эпитопов в подробном изложении.

Связывающие свойства пептидов по настоящему изобретению в отношении HLA можно тестировать для следующих HLA-типов в I классе: HLA-A1, HLA-A2, HLA-A3, HLA-A11, HLA-A24, HLA-A29, HLA-B7, HLA-B8, HLA-B14, HLA-B15, HLA-B27, HLA-B35, HLA-B40 и следующих HLA-типов в II классе: HLA-DR1, HLA-DR3, HLA-DR4, HLA-DR7, HLA-DR11, HLA-DR13, HLA-DR15. Пептиды синтезируют в виде Prospector PEPscreen®: Custom Peptide Library. Синтезируют пептиды длиной 8-15 аминокислот в количествах 0,5-2 мг с высокой средней чистотой. Контроль качества проводят масс-спектрометрией MALDI-TOF на 100% образцов.

С помощью теста оценки связывания REVEAL™ определяют способность каждого пептида-кандидата к связыванию с одним или более аллелем класса I МНС и стабилизацию комплекса МНС-пептид. Посредством сравнения связывания с эпитопами Т-клеток с высокой и средней аффинностью можно идентифицировать наиболее иммуногенные пептиды в белковой последовательности.

Детектирование основано на наличии или отсутствии нативной конформации комплекса МНС-пептид. Каждому пептиду дается балл относительно положительного контрольного пептида, который является известным эпитопом Т-клеток. Балл тестируемого пептида регистрируется количественно в виде процента от сигнала, генерированного положительным контрольным пептидом, и пептид детектируется как имеющий умозрительное прохождение в тесте или получивший отрицательный результат. Постановка теста подтверждается включением промежуточного контрольного пептида, о котором известно, что он связывается с более низкой аффинностью с аллелем, который исследуется.

Пример 4. Получение димерных пептидов.

Аминокислоты, которые связывают две мономерных пептидных последовательности, подчеркнуты. Вирус гриппа (M2e).

Конструкции, полученные из внеклеточного домена белка M2 вируса гриппа (M2e-домен).

Нативный домен

MSLLTEVETPINWGCRCNDSSD.

Готовили следующие последовательности или находятся на стадии получения. Различные части X¹-X⁶ разделены скобками.

BI100_CGnat [RR][SLLTEVETP][GCG][VETPIR][G][TPIRNEWG]
BI100_CG [RR][SL(Nle)TDIETP][GCG][IDTPIR][G][TPIBQDWG]

BI100-CGcyc [WWGC][TDIET][CG][IDTPIR][G][TPIBQDWG]
BI100-Cyc_2 [RRGC][SLLT][C][SLLTEVQTPIRN][GRR][SEWGSRSN]

BI150-димер [RR(Nle)C][SLLTEVQTPIRN][GRR][VETPIR]
|
[WWQC][TPIRSEWGCRSN]GRR[SNDSSG]

BI150-новый [WW][SL(Nle)TDIETP][GCG][IDTPIR][G][TPIBQDWG]
|
[RR(Har)][IDTPIR][G][TPIBQDWG][KG][SL(Nle)TDIETPG]

BI150-2mod [R][SLZTDIETP][Dpr(Aoa)][IDTPIR][G][TPIBQDWG]
|
[RR][IDTPIR][GG][TPI(Har)QEW][Dpr(Ser)][SLZTDIETPG]

Данная конструкция связывает мономерные пептиды посредством Dpr(Aoa) в первом пептиде с окисленным NaIO₄ остатком Dpr(Se) во втором пептиде.

Dpr(Aoa)=N-α-Fmoc-N-β-(N-трет-Вос-аминооксиацетил)-L-диаминопропионовая кислота.

Пояснения.

Скобки, использованные в последовательностях, указывают на различные части/блоки. Для BI100_CGnat/BI100_CG блоки будут иметь следующие аминокислотные последовательности:

Часть X ¹	RR	
Часть X ²	SLLTEVETP/SL(Nle)TDIETP	(aa 2-10 в нативном домене M2e)
Часть X ³	GCG	
Часть X ⁴	VETPIR/IDTPIR	(aa 7-12 в нативном домене M2e)
Часть X ⁵	G	
Часть X ⁶	TPIRNEWG/TPIBQDWG	(aa 9-16 в нативном домене M2e)

Блоки в части других последовательностей можно найти аналогичным образом.

Пример C5-последовательностей

BI450-AdjBT1 W_DW_LGCAKRRVCGGAKRRVVQREKRABI450-AdjBT2 W_DW_LGCIEEEGCGGIEEEGERDRBI400-B GAKRRVVGGCGGAKRRVVQREKRAGEREKRA

|
GKGGIEEEGGRDRDRGGEQDRDR

Примеры связанных дисульфидными связями конструкций могут представлять, не ограничиваясь этим, следующие связанные пептидные последовательности:

CGGAKRRVVGAKRRVVQREKRAV (SEQ ID NO:115)
|
CGGGDQQLGGAEIEIVGGIEEEGERDRDR (SEQ ID NO:116)

CGGAKRRVVGAKRRVVGGQREKR (SEQ ID NO:117)
|
CGGGDQQLGGAEIEIVGGIEEEGG (SEQ ID NO:118)

CGGAEIEVGGDQQL (SEQ ID NO:119)
|
GCGGAKRRVVGAKRRVV (SEQ ID NO:120)

Вышеприведенные связанные дисульфидными связями конструкции можно синтезировать, например, титрованием 2-пиридинсульфенил(SPyт)защищенных цистеинсодержащих пептидов с тиол-незащищенными пептидами. Было доказано, что это является более совершенным способом для избирательного получения связанных дисульфидными связями пептидных гетеродимеров, где предупреждается образование гомодимеров (Schutz A et al., Tetrahedron, Volume 56, Issue 24, 9 June 2000, pages 3889-3891). Можно получить аналогичные конструкции, в которых SEQ ID NO:115 связана дисульфидной связью с последовательностями SEQ ID NO:118 или 120, или в которых SEQ ID NO:117 связана дисульфидной связью с последовательностями SEQ ID NO:116 или 120, или в которых SEQ ID NO:119 связана дисульфидной связью с последовательностями SEQ ID NO:116 или 118.

Примеры связанных тиоэфирными связями конструкций могут представлять, не ограничиваясь этим, следующие связанные пептидные последовательности, которые получены от Bachem (Великобритания) Ltd:

GAKRRVVGGCGGAKRRVVQREKRAGEREKRA (SEQ ID NO: 121)
|
GKGGIEEEGGRDRDRGGEQDRDR (SEQ ID NO: 122)

(пептиды связаны посредством подчеркнутых остатков Cys и Lys; полная конструкция называется в данном документе BI400-B).

GAKRRVVGGCGGAKRRVVQREKRAGEREKRA (SEQ ID NO: 121)
|
GKGGIEEEGERDRDRGGQDRDR (SEQ ID NO: 124)

(пептиды связаны посредством подчеркнутых остатков Cys и Lys; полная конструкция называется в данном документе BI400-Bu1) .

GAKRRVVGGCGGAKRRVVEREKRAGQREKRA (SEQ ID NO: 125)
|
GKGGIEEEGGQDRDRGGRDRDR (SEQ ID NO: 126)

(пептиды связаны посредством подчеркнутых остатков Cys и Lys; полная конструкция называется в данном документе BI400-Bu2) .

GAKRRVVGGCGGAKRRVVEREKRAGQREKRA (SEQ ID NO: 125)
|
GKGGIEEEGGQDRDRGGERDRD (SEQ ID NO: 128)

(пептиды связаны посредством подчеркнутых остатков Cys и Lys; полная конструкция называется в данном документе BI400-Bu3) .

Как правило, линкер Cys-Lys устанавливается в виде тиоэфирной связи между цистеином в одном пептиде и дериватизованном бромацетилом лизином в другом пептиде.

Можно получить аналогичные конструкции, в которых SEQ ID NO:121 является Cys-Lys, связанным с последовательностями SEQ ID NO:126 или 128, или в которых SEQ ID NO:125 является Cys-Lys, связанным с последовательностями SEQ ID NO:122 или 124.

Примеры других связанных конструкций могут представлять, не ограничиваясь этим, следующие связанные пептидные последовательности,

GAKRRVVGGCGGAKRRVVQREKRAGEREKRA (SEQ ID NO: 129)
|
GKGGIEEEGGRDRDRGGEQDRDR (SEQ ID NO: 122)

(пептиды связаны посредством подчеркнутых остатков Ser и Lys) .

Как правило, линкер Ser-Lys устанавливается в виде оксимной связи между окисленным (альдегидом) серином в одном пептиде и (аминооксиацетилованным) дериватизованным лизином в другом

пептиде.

Пример 5.

Конструкция димерных пептидов HCV

BI350-1mod1:

RRGNWAKVLK~~KN~~WAKVI (SEQ ID NO: 130)

|

RRGLLADARVGC~~GSG~~ADRVCS (SEQ ID NO: 131)

Данная конструкция связывает мономерные пептиды через остаток лизина в первом пептиде с остатком цистеина во втором пептиде с использованием сульфо-SMCC-линкера

BI350-1mod2:

RRGNWAKVL(~~Dpr~~)NWAKVI (SEQ ID NO: 132)

|

RRGLLADARVG(~~Dpr(Ser)~~)GSGADRVCS (SEQ ID NO: 133)

Данная конструкция связывает мономерные пептиды через Dpr(Aoa) в первом пептиде с окисленным NaIO₄ остатком Dpr(Ser) во втором пептиде.

Dpr(Aoa)=N- α -Fmoc-N- β -(N-трет-Вос-аминоксиацетил)-L-диаминопропионовая кислота.

Альтернативно К или С можно заменить N- ϵ -метилованным Lys, который связан с Asp или Glu.

Следовательно, N- ϵ -метилованный Lys может быть связан с Asp или Glu пептидной связью боковой цепью с боковой цепью, где N-метилирование делает связь более стабильной.

Последовательности затем будут представлять (Lys(Me) относится к остатку N- ϵ -метилованного Lys)

RRGNWAKVL-Lys(Me)-NWAKVI (SEQ ID NO: 134)

|

RRGLLADARVGE~~GSG~~ADRVCS (SEQ ID NO: 135)

или

RRGNWAKVL-Lys(Me)-NWAKVI (SEQ ID NO: 134)

|

RRGLLADARVGD~~GSG~~ADRVCS (SEQ ID NO: 136)

или альтернативно, если связь обратная

RRGNWAKVL~~E~~NWAKVI (SEQ ID NO: 137)

|

RRGLLADARVG-Lys(Me)-GSGADRVCS (SEQ ID NO: 138)

или

RRGNWAKVL~~D~~NWAKVI (SEQ ID NO: 139)

|

RRGLLADARVG-Lys(Me)-GSGADRVCS (SEQ ID NO: 138)

Конструкция димерных пептидов вируса гриппа

BI150-2mod

R-SLZTDIETP-(~~Dpr~~)-IDTPIRGTPIBQDWG (SEQ ID NO: 140)

|

RR-IDTPIR-GG-TPI(Har)QEW-~~Dpr(Ser)~~-SLZTDIETPG (SEQ ID NO: 141)

Dpr представляет диаминопропионовую кислоту, Dpr(Ser) представляет серинилидиаминопропионовую кислоту (для образования оксимной связи Dpr-Dpr(Ser), как описано в данной заявке).

Нативную последовательность пептида из белка M2e вируса гриппа, на которую нацелена вышеприведенная конструкция, использовали для тестирования

BI100-cg2 MSLLETVETPIRNEWGCRC (SEQ ID NO: 142).

Пример 6. Иммунологические исследования.

Иммунизация кроликов.

Новозеландских кроликов самок (n=3) иммунизировали внутривенно на неделе 0, 2 и 6, используя 1 мл вакцины BI400-B, содержащей 500 мкг BI400-B в 50% об./об. адьюванте Фрейнда (т.е. полный адьювант Фрейнда, используемый для праймирования, с последующей повторной иммунизацией с неполным адьювантом Фрейнда). Выделяли сыворотку крови от отдельных кроликов для анализа ELISA.

Прямая ELISA для анализа сыворотки крови человека и кролика.

Используют 50-100 мкл BI400-B (предварительно инкубированного в буфере для покрытия - 0,05 M Na₂CO₃, pH 9,6; обозначенный далее СВ - на холоде в концентрации 16 мкг/мл для каждого пептида за 1-3 суток до покрытия) или просто СВ (фоновый контроль) использовался для покрытия лунок в микротитрационном планшете при 4°C в течение ночи. Затем микротитрационные планшеты отмывают 3× буфером для промывания (PBS+1% об./об. Тритон-X100; обозначенный далее WB) с последующим блокированием в течение 2 ч при комнатной температуре (RT) из расчета 200 мкл/лунку блокирующего буфера (PBS+1% мас./об. BSA). Затем планшеты отмывают 3× WB с последующей инкубацией при 37°C с 50-70

мкл/лунку добавленной человеческой (или кроличьей) сыворотки (серийные разведения в пределах от 1:1 до 1:250 в буфере для разведения (PBS+1% об./об. Тритон-X100+1% мас./об. BSA; обозначенный далее DB). Затем планшеты промывали 6× WB с последующей инкубацией при комнатной температуре с 70 мкл/лунку конъюгированного с щелочной фосфатазой белка G (3 мкг/мл в DB; Calbiochem 539305). Затем планшеты отмывают 6× WB с последующей инкубацией в течение 10-60 мин при комнатной температуре с 100 мкл/лунку 0,3% мас./об. фенофталейна монофосфата (Sigma P-5758). Наконец, планшеты гасят добавлением 100 мкл/лунку раствора для гашения (0,1 М Трис+0,1 М ЭДТА+0,5 М NaOH+0,01% мас./об. NaN_3 ; pH 14) с последующим анализом на ридере для ELISA (ASYS UVM 340) при 550 нм.

Результаты.

Результаты опыта по иммунизации B1400-B показывают, что возможно получить пептиды, которые вызывают сильный ответ антител. Специфичность данных ответов антител можно подтвердить конкурентной ELISA. Антитела, полученные к B1400-B на животных моделях, сравнимы с антителами, индуцированными при естественной инфекции HIV, и ассоциированы с отсутствием долгосрочного прогрессирования. Данные результаты показывают, что эти пептиды подходят для диагностики, а также разработки вакцины, нацеленной на HIV-индуцированную активацию иммунной системы, а также другие патогены.

Пример 7. Специфический ответ на белок M2e вируса гриппа, детектированный с использованием ELISA.

На сутки 1 образцы PBMC из крови доноров оттаивали, промывали теплой средой и инкубировали в колбах ($250000 \text{ PBMC}/\text{cm}^2$) в течение 24 ч при 37°C в атмосфере 5% CO_2 в покрывающем количестве культуральной среды (RPMI 1640 с ультраглутамином, Lonza, BE12-702F701; 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS), Fisher Scientific, номер по каталогу A15-101; смесью пенициллин/стрептомицин, Fisher Scientific, номер по каталогу P11-010) для обеспечения восстановления клеток после оттаивания. На сутки 2 клетки вносили в планшет для культивирования тканей Falcon Microtest, 96-луночный планшет с плоским дном из расчета 500000 клеток на лунку в объеме 200 мкл общей среды. В параллельные лунки вносили указанные индукторы в двойных параллелях или слева со средой в качестве контроля для инкубации в течение 6 суток при 37°C в атмосфере 5% CO_2 . Через 6 суток инкубации 100 мкл клеточной суспензии переносили в планшет ELISPOT (Millipore multiscreeen HTS), покрытый 1 мкг/мл нативного белка вируса гриппа M2e. Через 24 ч инкубации планшет промывали четыре раза PBS+0,05% твина 20 и пять раз PBS из расчета 200 мкл/лунку. Мышиный античеловеческий IgG или IgM биотин (Southern Biotech 9040-08 и 9020-08) разводили PBS с 0,5% FBS и инкубировали в течение 90 мин при 37°C. Отмывку повторяли, как описано, перед добавлением в каждую лунку 80 мкл стрептавидина-щелочной фосфатазы (Sigma Aldrich, S289) и инкубировали в течение 60 мин в темноте при комнатной температуре. Затем лунки промывали 2 раза PBS+0,05% твина 20 и 4 раза PBS, 200 мкл/лунку, перед добавлением субстрата для щелочной фосфатазы из набора Vector Blue Alkaline Phosphatase Substrate kit III (Vector Blue, SK-5300) и развивали в течение 7 мин при комнатной температуре. Реакцию останавливали проточной струей воды, планшеты высушивали, и пятно анализировали на ридере ELISPOT (CTL-ImmunoSpot® S5 UV Analyzer).

Специфический ответ на белок M2e вируса гриппа, детектированный с использованием ELISA.

Использовали 100 мкл антигена, как указано (предварительно инкубированного в буфере для покрытия - 0,05 М Na_2CO_3 , pH 9,6; обозначенный далее СВ - на холоде с концентрацией 8 мкг/мл за 1-3 суток до покрытия) или просто СВ (фоновый контроль) использовался для покрытия лунок в микротитрационном планшете при 4°C. Затем микротитрационные планшеты отмывали 3× буфером для промывания (PBS+1% об./об. Тритон-X100; обозначенный далее WB) с последующим блокированием в течение 2 ч при комнатной температуре (RT) из расчета 200 мкл/лунку блокирующего буфера (PBS+1% мас./об. BSA). Затем планшеты отмывали 3× WB с последующей инкубацией в течение 1 ч при 37°C с 50-70 мкл/лунку добавленной человеческой (или кроличьей или овечьей) сыворотки (серийные разведения в пределах от 1:5 до 1:250 в буфере для разведения (PBS+1% об./об. Тритон-X100+1% мас./об. BSA; обозначенный далее DB)). Затем планшеты промывали 6× WB с последующей инкубацией в течение 1 ч при комнатной температуре с 70 мкл/лунку конъюгированного с щелочной фосфатазой белка G (3 мкг/мл в DB; Calbiochem 539305) или козьего антимышиного IgG биотина (1 мкг/мл, Southern Biotech, 1030-08). В случае козьего антимышиного IgG биотина планшеты промывали еще одной дополнительной стадией, как описано, перед добавлением 100 мкл стрептавидина-щелочной фосфатазы (1 мкг/мл Sigma Aldrich, S289) и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. Затем планшеты промывали 6× WB с последующей инкубацией в течение 10-60 мин при комнатной температуре с 100 мкл/лунку 0,3% мас./об. фенофталейна монофосфата (Sigma P-5758). Наконец, планшеты гасили добавлением 100 мкл/лунку раствора для гашения (0,1М Трис+0,1М ЭДТА+0,5М NaOH+0,01% мас./об. NaN_3 ; pH 14) с последующим анализом на ридере для ELISA (ASYS UVM 340) при 550 нм. Активность сыворотки, т.е. показатель гуморального иммунного ответа, регистрировали в виде разведения сыворотки, которое дает описанную оптическую плотность (OD) или значения OD при указанном разведении сыворотки.

Результаты.

В табл. 2 показано относительное количество В-клеток, которое подверглось пролиферации, по сравнению с фоновой пролиферацией нестимулированных РВМС. Данные таблицы четко показывают, что BI150-2mod распознавался человеческими клетками иммунологической памяти, поскольку ответ был IgG-специфическим, означая, что BI150-2mod может стимулировать классзапускаемые В-клетки таким путем, который позволяет продуцированным антителам связываться с нативной последовательностью, из которой получен BI150-2mod. Большая вариация между отдельными донорами предполагалась, поскольку имеются существенные различия в человеческой популяции в отношении их ранее существующей гуморальной памяти к белку М2 вируса гриппа. Из данных табл. 2 также можно отметить, что BI150-2mod также был способен индуцировать пролиферацию IgM-несущих В-клеток.

Таблица 2

Ответ В-клеток в РВМС человека на BI150-2mod против нативной последовательности

РВМС из крови доноров								
	BC-39	BC-42	BC-28	BC-35	BC-31	BC-34	Среднее значение	Медианное
Индукторы выживаемости *	2200%	120%	111%	6625%	300%	100%	1576%	210%
IgG								
Индукторы выживаемости + BI150-2mod	2260%	440%	133%	1638%	300%	950%	953%	695%
IgM								
Индукторы выживаемости	3400%	3067%	22900%	300%	400%	3100%	5528%	3083%
Индукторы выживаемости + BI150-2mod	3400%	6783%	7600%	1700%	467%	1300%	3542%	3542%

* - индукторы выживаемости: лиганд rh-sCD40, Immuno Tools, 11343345, лиганд ODN 2006 Тип В CpG-олигонуклеотид-человеческий TLR9, Invivogen Sigma, Tlr-2006, rh IL-21, Immunotools, 11340213.

Мышей BALB/c вакцинировали подкожно 100 мкг на неделю 1; 3, 7, сыворотка с недели 9 с 1 мг Al-uminiun в виде 1,3% Alhydrogel. Данные табл. 3 показывают, что BI150-lmod1 индуцировал специфический иммунный ответ у мышей BALB/c, поскольку вакцинный антиген распознавался. Также совершенно очевидно, что полученный иммунный ответ является результатом класс запускающего события, поскольку иммунный ответ был IgG-специфическим.

Таблица 3

Сывороточный IgG иммунный ответ (OD) у мышей, вакцинированных BI350-lmod1+Alhydrogel, против вакцинного антигена

	Среднее значение (n=6)	SEM
BI350-lmod1	0,26	0,09

Овцу вакцинировали 500 мкг пептида в PBS со следующими адъювантами: ISA51 (неделя вакцинации 1, 2, 3, 4, сыворотка с недели 6) и адъювант Фрейнда (неделя вакцинации 1, 12, 26, сыворотка с недели 28). Данные табл. 4 показывают разведение сыворотки, которое соответствует значению OD, превышающему в три раза фоновый показатель. Данные таблицы четко указывают на то, что BI100-CG и BI100-CGсус индуцировали иммунный ответ сами по себе или с двумя различными стандартными адъювантами. Это указывает на то, что конструкции можно объединять с различными адъювантами и индуцировать IgG ответ, сигнал, который запускает иммунологическую память у овцы.

Таблица 4

Разведение сыворотки, превышающее в три раза фоновый IgG ответ у овцы, вакцинированной конструкциями BI100, нацеленными на антиген BI100-cg2

	BI100-CG	BI100CGсус
Адъювант Фрейнда	11000	125
ISA51	125	25
Без адъюванта	25	25

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Димерный пептид для индуцирования иммунного ответа у субъекта против вируса иммунодефицита человека (HIV), содержащий следующие последовательности мономерных пептидов:

GAKRRVVGGCGGAKRRVVQREKRAGEREKRA (SEQ ID NO: 121)

↓
GKGGIEEEGGRRDRDRGGQDRDR (SEQ ID NO: 147)

где указанные последовательности соединены через C¹⁰ в SEQ ID NO:121 и K² в SEQ ID NO:147.

2. Димерный пептид по п.1, где N- или C-концы последовательностей мономерных пептидов модифицированы амидированием или ацетилированием.

3. Димерный пептид по п.1 или 2, где C-концы последовательностей мономерных пептидов представляют собой амиды.

4. Димерный пептид по любому из пп.1-3, где последовательности мономерных пептидов соединены тиоэфирной связью между C¹⁰ в SEQ ID NO: 121 и K² в SEQ ID NO: 147.

5. Димерный пептид по любому из пп.1-4 в форме трифторацетатной соли.

6. Способ получения димерного пептида по п.1, согласно которому защищенные последовательности мономерных пептидов

GAKRRVVGGCGGAKRRVVQREKRAGEREKRA-NH₂ (SEQ ID NO: 121) и

GK(бромацетил)GGIEEEGGRRDRDRGGQDRDR-NH₂ (SEQ ID NO: 147)

реагируют с образованием гетеродимера, причем между K² в SEQ ID NO: 147 и C¹⁰ в SEQ ID NO: 121 образуется тиоэфирная связь.

7. Композиция для индуцирования у субъекта иммунного ответа против вируса иммунодефицита человека (HIV), содержащая димерный пептид по п.1.

8. Композиция для индуцирования у субъекта иммунного ответа против вируса иммунодефицита человека (HIV), содержащая димерный пептид по любому из пп.1-5 в комбинации с фармацевтически приемлемым разбавителем или носителем.

9. Композиция по п.8, дополнительно содержащая адъювант.

10. Вакцина, содержащая композицию по п.8 или 9 в форме жидкого раствора или суспензии.

11. Вакцина по п.10, где указанная композиция эмульгирована или инкапсулирована в липосомы.

12. Способ индукции у субъекта иммунного ответа против вируса иммунодефицита человека (HIV), который включает введение субъекту димерного пептида по любому из пп.1-5.

13. Способ снижения и/или замедления патологических эффектов вируса иммунодефицита человека (HIV) у инфицированного им субъекта, который включает введение субъекту терапевтически эффективного количества димерного пептида по любому из пп.1-5.

14. Применение димерного пептида по любому из пп.1-5 в диагностическом анализе вируса иммунодефицита человека (HIV) in vitro, который представляет собой ELISA.

15. Образец мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC), стимулированных димерным пептидом по любому из пп.1-5, для анализа активности цитотоксических Т-клеток (CTL) или хелперных Т-лимфоцитов (HTL).

16. Способ оценки иммуногенности вакцины с димерным пептидом по любому из пп.1-5, согласно которому получают образец мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC) пациента, которому введена указанная вакцина, и определяют в полученном образце PBMC эпитопспецифические CTL или HTL, присутствие которых свидетельствует об иммуногенности вакцины.



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2