



(51) МПК

A61K 39/35 (2006.01)*A61K 39/385* (2006.01)*A61P 37/08* (2006.01)

**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ(21)(22) Заявка: **2007138265/15**, 17.03.2006(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
17.03.2006

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
18.03.2005 US 60/662,918(43) Дата публикации заявки: **27.04.2009** Бюл. № 12(45) Опубликовано: **20.03.2011** Бюл. № 8

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: **WO 03/040164A2**, 15.05.2003. **Vailes L.D. et al.**, High level expression of immunoreactive recombinant cat allergen (Fel d): Targeting to antigen-presenting cells, *Allergy Clin. Immunol.*, 2002, Nov., v.110, №5, pp.757-762. **KAISER L. et al.**, The crystal structure of the major cat allergen Fe1 d1, a member of the secretoglobulin family, *J.Biol. Chem.*, 2003 Sep. v.278, №39, pp.37730-37735.

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на национальной фазе: **18.10.2007**(86) Заявка РСТ:
EP 2006/060845 (17.03.2006)(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2006/097530 (21.09.2006)

Адрес для переписки:

**101000, Москва, М.Златоустинский пер., 10,
кв.15, "ЕВРОМАРКПАТ", пат.пов.
Н.В.Кузенковой**

(72) Автор(ы):

**БАХМАНН Мартин (CH),
БАУЕР Моника (CH),
ДИТМАЙЕР Клаус (CH),
ШМИТЦ Николе (CH),
УТЦИНГЕР Штефан (CH)**

(73) Патентообладатель(и):

ЦИТОС БИОТЕХНОЛОГИ АГ (CH)**(54) БЕЛКИ, СЛИТЫЕ С КОШАЧЬИМ АЛЛЕРГЕНОМ, И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ**

(57) Реферат:

Изобретение относится к области медицины и касается белков, слитых с кошачьим аллергеном и их применения. Сущность изобретения включает композиции, содержащие вирусоподобную частицу (ВПЧ) или вирусную частицу и по меньшей мере один антиген, прежде всего по меньшей мере, один кошачий антиген, и

более конкретно по меньшей мере один кошачий антиген, который является человеческим аллергеном. В конкретных вариантах осуществления изобретения антиген представляет собой кошачий антиген Fe1 d1 или его фрагмент, ковалентно связанный с ВПЧ. Изобретение можно применять для получения вакцин, предназначенных прежде всего для

лечения и/или предупреждения аллергии на
кошачью перхоть и другие кошачьи антигены и

аллергены. 5 н. и 20 з.п. ф-лы, 5 табл., 4 ил.

RU 2 4 1 4 2 3 9 C 2

RU 2 4 1 4 2 3 9 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

(51) Int. Cl.

A61K 39/35 (2006.01)**A61K 39/385** (2006.01)**A61P 37/08** (2006.01)(12) **ABSTRACT OF INVENTION**(21)(22) Application: **2007138265/15, 17.03.2006**(24) Effective date for property rights:
17.03.2006

Priority:

(30) Priority:
18.03.2005 US 60/662,918(43) Application published: **27.04.2009 Bull. 12**(45) Date of publication: **20.03.2011 Bull. 8**(85) Commencement of national phase: **18.10.2007**(86) PCT application:
EP 2006/060845 (17.03.2006)(87) PCT publication:
WO 2006/097530 (21.09.2006)Mail address:
**101000, Moskva, M.Zlatoustinskij per., 10, kv.15,
"EVROMARKPAT", pat.pov. N.V.Kuzenkovej**

(72) Inventor(s):

**BAKhMANN Martin (CH),
BAUER Monika (CH),
DITMAJER Klaus (CH),
ShMITTs Nikole (CH),
UTTsINGER Shtefan (CH)**

(73) Proprietor(s):

TsITOS BIOTEKhnOLOGI AG (CH)(54) **CAT ALLERGEN FUSED PROTEIN AND APPLICATION THEREOF**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: invention refers to medicine and concerns cat allergen fused proteins and application thereof. Substance of the invention involves a compositions containing a virus-like particle (VLP) or a viral particle and at least, one antigen, first of all at least, one cat antigen, and more specifically at least one cat antigen which is human

allergen. In specific versions of the invention, said antigen represents cat antigen Fel d1 or its fragment covalently bound with the VLP.

EFFECT: invention can be applied for preparing vaccines first of all aimed at treatment and/or prevention of cat dander allergy and other cat antigens and allergens responses.

25 cl, 20 ex, 5 tbl, 4 dwg

Предпосылки создания изобретения

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к областям медицины, общественного здравоохранения, иммунологии, молекулярной биологии и вирусологии. В изобретении предложены композиции, содержащие вирусоподобную частицу (ВПЧ) или вирусную частицу и по меньшей мере один антиген, прежде всего по меньшей мере один кошачий антиген, и наиболее конкретно по меньшей мере один кошачий антиген, который является человеческим аллергеном. В конкретных вариантах осуществления изобретения антиген представляет собой антиген Fe1 d1 или его фрагмент, ковалентно связанный с ВПЧ. В изобретении предложены также способы получения композиций. Композиции, предлагаемые в изобретении, индуцируют эффективные иммунные ответы, прежде всего гуморальные иммунные ответы, у млекопитающих, прежде всего у человека. Композиции и способы, предлагаемые в изобретении, можно применять для получения вакцин, предназначенных прежде всего для лечения и/или профилактики аллергии на кошачью перхоть и другие кошачьи антигены и аллергены.

Ссылка на родственные заявки

Домашняя кошка (*Felis domesticus*) является важным источником аллергенов в помещениях (Lau S. и др., *Lancet* 356, 2000, сс.1392-1397). Так, кошек содержат примерно в 25% домов в западных странах, и аллергия на кошек обнаружена у значительной части популяции. Серьезность симптомов колеблется от относительно слабого ринита и конъюнктивита до потенциально опасного для жизни обострения астмы.

Хотя в некоторых случаях у пациентов наблюдается сенсibilизация некоторыми другими молекулами кошачьей перхоти и шерсти, основным аллергеном является Fe1 d1 (т.е. аллерген 1 *Felis domesticus*; ранее обозначали как Cat 1, т.е. кошачий аллерген 1). Важность этого аллергена доказана в многочисленных исследованиях. Фактически более чем у 80% пациентов, страдающих аллергией на кошек, вырабатываются антитела типа IgE на этот сильный аллерген (van Ree R. и др., *J. Allergy Clin Immunol* 104, 1999, сс.1223-1230).

Fe1 d1 представляет собой кислый гликопротеин с молекулярной массой 35-39 кДа, содержащий 10-20% N-связанных углеводов, и он обнаружен в шерсти, слюне и слезных железах кошек. Он состоит из двух нековалентно связанных гетеродимеров. Каждый гетеродимер состоит из одного пептида, содержащего 70 остатков (обозначен как «цепь 1»), и одного пептида, содержащего 78, 85, 90 или 92 остатка (обозначен как «цепь 2»), которые кодируются различными генами (см. Duffort O.A. и др., *Mol Immunol* 28, 1991, сс.301-309; Morgenstern J.P. и др., *Proc Natl Acad Sci USA* 88, 1991, сс.9690-9694 и Griffith I.J. и др., *Gene* 113, 1992, сс.263-268).

Лечение пациентов, страдающих аллергией на кошек, в настоящее время осуществляют посредством десенсибилизирующей терапии, которая включает повторные инъекции возрастающими дозами либо неочищенного экстракта кошачьей перхоти, либо коротких пептидов, полученных из Fe1 d1. У Lilja с соавторами и Hedlin с соавторами описана программа десенсибилизации, в процессе которой страдающим аллергией на кошек пациентам вводят неочищенные экстракты кошачьей перхоти (Lilja Q и др., *J Allergy Clin Immunol* 83, 1989, сс.37-44 и Hedlin и др., *J Allergy Clin Immunol* 87, 1991, сс.955-964). Для осуществления этой программы требуется по меньшей мере 2-3 года, и пациенты после трехлетнего лечения все еще сохраняют системные симптомы. Применение для десенсибилизации

коротких пептидов, полученных из Fe1 d1, приводит к несущественным различиям между группой, обработанной пептидов, и группой, обработанной плацебо (Oldfield W.L. и др., Lancet 360, 2002, сс.47-53). Эффективность была обнаружена только тогда, когда пациентам вводили короткий пептид в большом количестве (750 мкг) (Norman P.S. и др., Am J Respir Crit Care Med 154, 1996, сс.1623-1628).

Связанные с аллергией побочные действия, такие как астматические реакции замедленного типа, обнаружены как при лечении неочищенным экстрактом кошачьей перхоти, так и при лечении короткими пептидами. Таким образом, анафилактический шок, вызываемый инъеклируемым аллергеном, имеет очень большое значение для безопасности любой программы десенсибилизации. Однако устранение этого явления посредством снижения количества инъеклируемого аллергена либо снижает эффективность лечения, либо удлиняет период лечения. Таким образом, в области лечения аллергии на кошек существует большая потребность в альтернативных режимах десенсибилизации и, прежде всего, в режимах десенсибилизации, которые позволяют снижать аллергические симптомы, но не стимулируют связанную с аллергией побочную реакцию.

Краткое изложение сущности изобретения

При создании изобретения неожиданно было установлено, что предлагаемые в изобретении композиции и вакцины соответственно, которые содержат по меньшей мере один антиген Fe1 d1 или его фрагмент, предлагаемый в изобретении, не только не обладают способностью индуцировать иммунные ответы на Fe1 d1 и прежде всего гуморальные иммунные ответы, но также могут оказывать десенсибилизирующее действие на пациента, страдающего аллергией на кошек, и, в частности, при кратковременном использовании, выявлена высокая эффективность предлагаемых в изобретении композиций и вакцин соответственно. Кроме того, при создании изобретения неожиданно было установлено, что Fe1 d1, предлагаемый в изобретении, когда его ковалентно связывают с ВПЧ, предлагаемой в изобретении, обладает резко пониженной анафилактической активностью по сравнению с Fe1 d1, предлагаемым в изобретении, не связанным ковалентно с ВПЧ, сохраняя при этом высокую степень антигенности и иммуногенности. Это является важным преимуществом по сравнению с известными из прототипов схемами лечения аллергии на кошек, поскольку предлагаемые в изобретении композиции и вакцины соответственно резко снижают риск возникновения анафилактического шока у иммунизированных животных и людей. Кроме того, предлагаемые в изобретении композиции и вакцины соответственно позволяют применять антиген в существенно более высоких дозах по сравнению с дозами, которые применяли в известных из прототипов схемах лечения аллергии на кошек, что, в свою очередь, может повышать эффективность и/или укорачивать всю программу десенсибилизации. Таким образом, предлагаемые в изобретении композиции и вакцины соответственно индуцируют сильные иммунные ответы против Fe1 d1, но не стимулируют аллергическую реакцию.

Таким образом, первым объектом настоящего изобретения является композиция, содержащая (а) коровую частицу, которая несет по меньшей мере один первый сайт присоединения, где коровая частица представляет собой вирусоподобную частицу (ВПЧ) или вирусную частицу; и (б) по меньшей мере один антиген, который несет по меньшей мере один второй сайт присоединения, где по меньшей мере один антиген представляет собой белок Fe1 d1 или фрагмент Fe1 d1, и где (а) и (б) ковалентно связаны через по меньшей мере один первый и по меньшей мере один второй сайт

присоединения, предпочтительно с образованием упорядоченного и повторяющегося набора антигенов. Другим объектом настоящего изобретения является композиция вакцины. Кроме того, настоящее изобретение относится к способу введения композиции вакцины человеку или млекопитающему кроме человека, такому как собака, которые страдают аллергией на кошек, предпочтительно на кошачий Fe1 d1. В одном из предпочтительных вариантов осуществления изобретения в состав вакцины входит также по меньшей мере один адъювант. Однако композиция вакцины, предлагаемая в изобретении, обладает способностью индуцировать сильный иммунный ответ, прежде всего гуморальный иммунный ответ, и при отсутствии по меньшей мере одного адъюванта. Таким образом, в одном из предпочтительных вариантов осуществления изобретения в вакцине отсутствует адъювант. Отказ от применения адъюванта может снижать вероятность возникновения возможных побочных действий, связанных с применением адъювантов.

В одном из предпочтительных вариантов осуществления изобретения ВПЧ, входящую в состав композиции и композиции вакцины соответственно, получают рекомбинантно в хозяине, и ВПЧ практически свободна от РНК хозяина, предпочтительно свободна от нуклеиновых кислот хозяина. Снижение или предпочтительно элиминация нуклеиновых кислот хозяина, предпочтительно отсутствие нуклеиновых кислот хозяина, является важным устранением нежелательных Т-клеточных ответов, а также других нежелательных побочных действий, таких как лихорадка.

В одном из предпочтительных вариантов осуществления изобретения композиция, предлагаемая в изобретении, содержит также по меньшей мере одну иммуностимулирующую субстанцию, предпочтительно по меньшей мере одну иммуностимулирующую нуклеиновую кислоту. Еще в одном предпочтительном варианте осуществления изобретения иммуностимулирующую нуклеиновую кислоту упаковывают внутрь ВПЧ, предлагаемой в изобретении. Введение иммуностимулирующих субстанций, предпочтительно иммуностимулирующих нуклеиновых кислот, в композицию, предлагаемую в изобретении, может сдвигать иммунные ответы в сторону Th1-ответов и тем самым подавлять Th2-ответы и, как следствие, производство IgE.

Одним из объектов настоящего изобретения является способ лечения аллергии на кошек, заключающийся в том, что индивидууму, который страдает аллергией на кошек, предпочтительно человеку, вводят предлагаемую в изобретении композицию или вакцину соответственно.

Следующим объектом настоящего изобретения является фармацевтическая композиция, содержащая композицию, предлагаемую в изобретении, и приемлемый фармацевтический носитель.

И еще одним объектом настоящего изобретения является способ получения предлагаемой в изобретении композиции, заключающийся в том, что (а) получают коровую частицу, которая несет по меньшей мере один первый сайт присоединения, где коровая частица представляет собой вирусоподобную частицу (ВПЧ) или вирусную частицу; и (б) получают по меньшей мере один антиген, который несет по меньшей мере один второй сайт присоединения, где по меньшей мере один антиген представляет собой белок Fe1 d1 или фрагмент Fe1 d1, и (в) объединяют коровую частицу и по меньшей мере один антиген с получением композиции, где по меньшей мере один антиген и коровая частица связаны с помощью по меньшей мере одного

первого и по меньшей мере одного второго сайтов присоединения.

Один из объектов изобретения является слитый белок Fe1 d1, который содержит цепь 1 Fe1 d1 и цепь 2 Fe1 d1, слитые через аминокислотный спейсер, который связывает N-конец одной цепи с С-концом другой цепи, где аминокислотный спейсер состоит из 10-30 аминокислотных остатков и где слитый белок получают в E.coli или где слитый белок не является гликозилированным.

Краткое описание чертежей

На чертежах показано:

на фиг.1 - окрашенные кумасси очищенные и ренатурированные слитые белки Fe1 d1 при электрофорезе в ДСН-ПААГ при использовании невосстанавливающих гелей. В образцы, представленные в полосе 1, был добавлен дитиотреитол (ДТТ) в качестве восстановителя. В образцы, представленные в полосе 2, ДТТ не добавляли;

на фиг.2 - дегрануляция базофилов при использовании либо только слитых белков Fe1 d1, либо слитых белков Fe1 d1, связанных с Q β . По оси абсцисс отложена концентрация соответствующего белка Fe1 d1. По оси ординат отложен процент базофилов, подвергшихся дегрануляции;

на фиг.3 - результаты инъекционной кожной пробы добровольца, страдающего аллергией на кошек, которому вводили Q β -FELD1 в день 0, 7 и 14 и проводили также пробы в день 0, 14 и 21;

на фиг.4А - балл при использовании возрастающих назальных доз и общий назальный балл (фиг.4Б) для добровольца, страдающего аллергией на кошек, которому вводили Q β -FELD1 в день 0, 7 и 14 и проводили также пробы в день 0, 14 и 21.

Подробное описание изобретения

Если не указано иное, все технические и научные понятия, употребляемые в настоящем описании, имеют общепринятые значения, очевидные специалисту в области, к которой относится настоящее изобретение.

Адъювант: Понятие «адъювант» в контексте настоящего описания относится к неспецифическим стимуляторам иммунного ответа или субстанциям, которые обеспечивают образование депо в хозяине, и при объединении с предлагаемыми в настоящем изобретении вакциной и фармацевтической композицией соответственно могут еще в большей степени усиливать иммунный ответ. Можно применять различные адъюванты. Их примерами являются полный и неполный адъювант Фрейнда, гидроксид алюминия и модифицированный мурамилдипептид. Кроме того, адъювантами являются минеральные гели, такие как гидроксид алюминия, поверхностно-активные вещества, такие как лизолецитин, плурононовые полиолы, полианионы, пептиды, масляные эмульсии, гемоцианины лимфы улитки, динитрофенол, и адъюванты, которые потенциально можно применять для введения человеку, такие как БЦЖ (бацилла Кальмета-Герена) и *Corynebacterium parvum*. Такие адъюванты также хорошо известны в данной области. Другие адъюванты, которые можно вводить в сочетании с композициями, предлагаемыми в изобретении, включают (но не ограничиваясь ими) монофосфорильный липидный иммуномодулятор, AdjuVax 100a, QS-21, QS-18, CRL1005, соли алюминия (квасцы), MF-59, OM-174, OM-197, OM-294 и адъювант, применяемый в Virosomal -технологии (вирус-липосомной вакцине). Адъюванты могут представлять собой также смеси этих соединений. Как правило, ВПЧ представляет собой адъювант. Однако, когда понятие «адъювант» упоминается в контексте настоящего описания, то оно относится к адъюванту, который не является ВПЧ, применяемой в композициях,

предлагаемых в настоящем изобретении, но который добавлен к ВПЧ.

Антиген: В контексте настоящего описания понятие «антиген» относится к молекуле, которая обладает способностью связываться с антителом или Т-клеточным рецептором (ТКР), если презентруется с помощью молекул ГКГ.

Понятие «антиген» в контексте настоящего описания включает также Т-клеточные эпитопы. Кроме того, антиген обладает способностью распознаваться иммунной системой и/или обладает способностью индуцировать гуморальный иммунный ответ и/или клеточный иммунный ответ, что приводит к активации В- и/или Т-лимфоцитов.

Однако по меньшей мере в некоторых случаях, антиген может содержать или быть связанным с Th-клеточным эпитопом и использоваться в адъюванте. Антиген может нести один или несколько эпитопов (В- и Т-эпитопы). Описанная выше специфическая реакция подразумевает, что антиген должен предпочтительно реагировать, как правило, с высокой степенью избирательности, с соответствующим ему антителом или ТКР и не вступать в реакцию с множеством других антител или ТКР, которые могут вырабатываться в ответ на другие антигены. В контексте настоящего описания антигены могут представлять также смеси нескольких индивидуальных антигенов.

Антигенная детерминанта: Понятие «антигенная детерминанта» и «антигенный эпитоп», которые в контексте настоящего описания используются взаимозаменяемо, относится к непрерывным или прерывистым областям полипептида, которые могут иммуноспецифически связываться с антителом или Т-клеточным рецептором в контексте молекулы ГКГ. Иммуноспецифическое связывание исключает неспецифическое связывание, но не обязательно исключает перекрестную реактивность. Антигенная детерминанта, как правило, содержит 5-10 аминокислот в пространственной конформации, которая является уникальной для антигенной детерминанты.

Ассоциированный: Понятие «ассоциированный» (или соответствующее ему существительное ассоциация) в контексте настоящего описания относится ко всем возможным путям, предпочтительно химическим взаимодействиям, с помощью которых две молекулы соединяются друг с другом. Химические взаимодействия включают ковалентные и нековалентные взаимодействия. Типичными примерами нековалентных взаимодействий являются ионные взаимодействия, гидрофобные взаимодействия или водородные связи, где основой ковалентных взаимодействий являются, например, ковалентные связи, такие как сложноэфирные связи, связи, образованные с помощью простого эфира, сложного фосфоэфира, амидные, пептидные связи, связи типа углерод-фосфор, связи типа углерод-сера, такие как тиоэфирные связи, или имидные связи.

Сайт присоединения, первый: в контексте настоящего описания понятие «первый сайт присоединения» относится к элементу, который встречается в естественных условиях в ВПЧ или который искусственно добавляют к ВПЧ, и с которым может связываться второй сайт присоединения. Первый сайт присоединения может представлять собой белок, полипептид, аминокислоту, пептид, сахар, полинуклеотид, природный или синтетический полимер, вторичный метаболит или соединение (биотин, флуоресцеин, ретинол, дигоксигенин, ионы металлов, фенилметилсульфонилфторид), или химически реактивную группу, такую как аминогруппа, карбоксильная группа, сульфгидрильная группа, гидроксильная группа, гуанидинильная группа, гистидинильная группа, или их комбинацию. В предпочтительном варианте осуществления изобретения химически реактивная

группа в качестве первого сайта присоединения представляет собой аминокислоту, такой как лизин. Первый сайт присоединения локализован, как правило, на поверхности, и предпочтительно на наружной поверхности ВПЧ.

Множество первых сайтов присоединения присутствует на поверхности,

предпочтительно на наружной поверхности вирусоподобной частицы, как правило, они имеют повторяющуюся конфигурацию. В предпочтительном варианте осуществления изобретения первый сайт присоединения ассоциирован с ВПЧ с помощью по меньшей мере одной ковалентной связи, предпочтительно с помощью по меньшей мере одной пептидной связи. В другом предпочтительном варианте осуществления изобретения первый сайт присоединения представляет собой сайт, встречающийся в естественных условиях в ВПЧ. В другом варианте первый сайт присоединения искусственно добавляют к ВПЧ.

Сайт присоединения, второй: в контексте настоящего описания понятие «второй сайт присоединения» относится к элементу, который встречается в естественных условиях в сочетании с Fe1 d1, предлагаемым в настоящем изобретении, или который искусственно добавлен к нему, и с которым может связываться первый сайт присоединения. Второй сайт присоединения Fe1 d1, предлагаемого в изобретении, может представлять собой белок, полипептид, пептид, аминокислоту, сахар, полинуклеотид, природный или синтетический полимер, вторичный метаболит или соединение (биотин, флуоресцеин, ретинол, дигоксигенин, ионы металлов, фенилметилсульфонилфторид), или химически реактивную группу, такую как аминокислотная группа, карбоксильная группа, сульфгидрильная группа, гидроксильная группа, гуанидинильная группа, гистидинильная группа, или их комбинацию. В предпочтительном варианте осуществления изобретения химически реактивная группа в качестве второго сайта присоединения представляет собой сульфгидрильную группу аминокислоты, такой как цистеин. Таким образом, понятие «белок Fe1 d1, несущий по меньшей мере один второй сайт присоединения» относится к конструкции, содержащей Fe1 d1, предлагаемый в изобретении, и по меньшей мере один второй сайт присоединения. Однако в случае второго сайта присоединения, который не встречается в естественных условиях в сочетании с Fe1 d1, такая конструкция, как правило и предпочтительно, дополнительно, содержит «линкер». В другом предпочтительном варианте осуществления изобретения второй сайт присоединения ассоциирован с Fe1 d1, предлагаемым в изобретении, с помощью по меньшей мере одной ковалентной связи, предпочтительно через с помощью по меньшей мере одной пептидной связи. В другом варианте осуществления изобретения второй сайт присоединения представляет собой сайт, встречающийся в естественных условиях в Fe1 d1, предлагаемом в изобретении. В другом предпочтительном варианте осуществления изобретения второй сайт присоединения искусственно добавляют к Fe1 d1, предлагаемому в изобретении, через аминокислотный линкер, предпочтительно содержащий цистеин. Предпочтительно линкер сливают с Fe1 d1, предлагаемым в изобретении, пептидной связью.

Оболочечный белок: В контексте настоящего описания понятие «оболочечный белок» и понятие «капсидный белок», которые используются взаимозаменяемо в контексте настоящего описания, относятся к вирусному белку, предпочтительно субъединице встречающегося в естественных условиях капсида вируса, предпочтительно РНК содержащего фага, который можно включать в вирусный капсид или ВПЧ.

Fe1 d1, предлагаемый в изобретении: Понятие «Fe1 d1, предлагаемый в

изобретении» в контексте настоящего описания относится по меньшей мере к одному белку Fe1 d1 или по меньшей мере одному фрагменту Fe1 d.

Цепь 1 Fe1 d1: Понятие «цепь 1 Fe1 d1» в контексте настоящего описания относится к полипептиду, который содержит или в другом варианте состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:22, или гомологичной ей последовательности. Понятие «последовательность, гомологичная SEQ ID NO:22» в контексте настоящего описания относится к полипептиду, который идентичен SEQ ID NO:22 более чем на 70%, предпочтительно более чем на 80%, более предпочтительно более чем на 90% и еще более предпочтительно более чем на 95%. Понятие «цепь 1 Fe1 d1» в контексте настоящего описания относится также к полипептиду, который несет по меньшей мере одну пост-трансляционную модификацию, включающую (но, не ограничиваясь ими) по меньшей мере одно гликозилирование цепи 1 Fe1 d1, как она определена в настоящем описании. Предпочтительно цепь 1 Fe1 d1, как она определена в настоящем описании, состоит в целом максимум из 130, еще более предпочтительно максимум из 100 аминокислот.

Цепь 2 Fe1 d1: Понятие «цепь 2 Fe1 d1» в контексте настоящего описания относится к полипептиду, который содержит или в другом варианте состоит из аминокислотных последовательностей, представленных в SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:25 или SEQ ID NO:26, или гомологичной ей последовательности. Понятие «последовательность, гомологичная SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:25 или SEQ ID NO:26» в контексте настоящего описания относится к полипептиду, который идентичен SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:25 или SEQ ID NO:26 более чем на 70%, предпочтительно более чем на 80%, более предпочтительно более чем на 90% и еще более предпочтительно более чем на 95%. Понятие «цепь 2 Fe1 d1» в контексте настоящего описания относится также к полипептиду, который несет по меньшей мере одну пост-трансляционную модификацию, включающую (но, не ограничиваясь ими) по меньшей мере одно гликозилирование цепи 2 Fe1 d1, как она определена в настоящем описании. Предпочтительно цепь 2 Fe1 d1, как она определена в настоящем описании, состоит в целом максимум из 150, еще более предпочтительно максимум из 130 и еще более предпочтительно максимум из 100 аминокислот.

Белок Fe1 d1: Понятие «белок Fe1 d1» в контексте настоящего описания относится к белку, который содержит или в другом варианте состоит из цепи 1 Fe1 d1 и цепи 2 Fe1 d1. Предпочтительно цепь 1 Fe1 d1 и цепь 2 Fe1 d1 связаны ковалентно. В одном предпочтительном варианте осуществления изобретения цепь 1 Fe1 d1 и цепь 2 Fe1 d1 связаны с помощью по меньшей мере одной дисульфидной связи. В другом варианте осуществления изобретения цепь 1 и цепь 2 слиты непосредственно или с помощью спейсера, в этом случае белок Fe1 d1 дополнительно содержит или в другом варианте представляет собой спейсер. Предпочтительно белок Fe1 d1, как он определен в настоящем описании, состоит в целом максимум из 300, еще более предпочтительно максимум из 200 аминокислот. Как правило и предпочтительно, белок Fe1 d1, предлагаемый в изобретении, обладает способностью индуцировать *in vivo* производство антитела, которое специфически связывается либо с встречающимся в естественных условиях Fe1 d1, либо с рекомбинантным Fe1 d1, который получают согласно методу, описанному в примере 5 настоящего описания.

Фрагмент Fe1 d1: Понятие «фрагмент Fe1 d1» в контексте настоящего описания относится к полипептиду, который содержит или в другом варианте состоит по меньшей мере из одной антигенной детерминанты Fe1 d1. Как правило и

предпочтительно, понятие «фрагмент Fe1 d1» в контексте настоящего описания относится к полипептиду, который содержит или в другом варианте состоит по меньшей мере из двух антигенных детерминант Fe1 d1. Предпочтительно антигенные детерминанты ковалентно связаны, предпочтительно также антигенные

детерминанты связаны с помощью по меньшей мере одной пептидной связи, в этом случае может требоваться спейсер между антигенными детерминантами.

Предпочтительно по меньшей мере две антигенные детерминанты обе получают из цепи 1 Fe1 d1 и из цепи 2 Fe1 d1. Предпочтительно фрагмент Fe1 d1, как он определен в настоящем описании, состоит в целом максимум из 130, еще более предпочтительно максимум из 100 и еще более предпочтительно из 60 аминокислот. Как правило и предпочтительно, фрагмент Fe1 d1, предлагаемый в изобретении, обладает способностью индуцировать *in vivo* производство антитела, которое специфически связывается либо с встречающимся в естественных условиях Fe1 d1, либо с рекомбинантным Fe1 d1, который получают согласно методу, описанному в примере 5 настоящего описания.

Связанный: Понятие «связанный» (или существительное: связь) в контексте настоящего описания относится ко всем возможным путям, предпочтительно химическим взаимодействиям, с помощью которых соединяют вместе по меньшей мере один первый сайт присоединения и по меньшей мере один второй сайт присоединения. Химические взаимодействия представляют собой ковалентные и нековалентные взаимодействия. Типичными примерами нековалентных взаимодействий являются ионные взаимодействия, гидрофобные взаимодействия или водородные связи, в то время как ковалентные взаимодействия базируются, например, на ковалентных связях, таких как сложноэфирные связи, связи, образованные с помощью простого эфира, сложного фосфоэфира, амидные, пептидные, связи типа углерод-фосфор, связи типа углерод-сера, такие как тиоэфирные связи, или имидные связи. В конкретных предпочтительных вариантах осуществления изобретения первый сайт присоединения и второй сайт присоединения связывают с помощью по меньшей мере одной ковалентной связи, предпочтительно с помощью по меньшей мере одной непептидной связи и еще более предпочтительно с помощью только непептидной(ых) связи(ей). Однако понятие «связанный» в контексте настоящего описания не относится только к непосредственному связыванию по меньшей мере одного первого сайта присоединения и по меньшей мере одного второго сайта присоединения, но в другом варианте и предпочтительно относится к опосредованному связыванию по меньшей мере одного первого сайта присоединения и по меньшей мере одного второго сайта присоединения через промежуточную(ые) молекулу(ы), и для их создания, как правило и предпочтительно, используют по меньшей мере один, предпочтительно один, гетеробифункциональный перекрестносшивающий агент.

Линкер: «Линкер» в контексте настоящего описания либо ассоциирует второй сайт присоединения с Fe1 d1, предлагаемым в изобретении, или уже содержит, практически состоит или состоит из второго сайта присоединения. Предпочтительно «линкер» в контексте настоящего описания уже содержит второй сайт присоединения, как правило, но не обязательно, в виде одного аминокислотного остатка, предпочтительно остатка цистеина. Понятие «линкер» в контексте настоящего описания обозначают также как «аминокислотный линкер», прежде всего, когда линкер, предлагаемый в изобретении, содержит по меньшей мере один аминокислотный остаток. Таким образом, понятия «линкер» и «аминокислотный

линкер» в контексте настоящего описания используют взаимозаменяемо. Однако не предусматривается, что линкер состоит только из аминокислотных остатков, даже, если состоящий из аминокислотных остатков линкер является предпочтительным вариантом осуществления настоящего изобретения. Аминокислотные остатки линкера предпочтительно представляют собой встречающиеся в естественных условиях аминокислоты или не встречающиеся в естественных условиях аминокислоты, известные в данной области, включая их полностью L- или полностью D-изомеры и их смеси. Другими предпочтительными вариантами линкера, предлагаемого в настоящем изобретении, являются молекулы, содержащие сульфгидрильную группу или цистеиновый остаток, и, следовательно, такие молекулы также подпадают под объем изобретения. Другие линкеры, которые можно применять согласно настоящему изобретению, представляют собой молекулы, содержащие C₁-C₆алкильный, циклоалкильный, такой как циклопентильный или циклогексильный, циклоалкенильный, арильный или гетероарильный фрагмент. Однако линкеры, содержащие предпочтительно C₁-C₆алкильный, циклоалкильный (C₅, C₆), арильный или гетероарильный фрагмент и дополнительную(ые) аминокислоту(ы), можно применять также в качестве линкеров, предлагаемых в настоящем изобретении, и они подпадают под объем настоящего изобретения. Ассоциацию линкера с Fe1 d1, предлагаемым в изобретении, предпочтительно осуществляют с помощью по меньшей мере одной ковалентной связи, более предпочтительно по меньшей мере одной пептидной связи.

Упорядоченный и повторяющийся набор антигенов: В контексте настоящего описания понятие «упорядоченный и повторяющийся набор антигенов», в целом, относится к повторяющейся организации антигенов, как правило и предпочтительно, отличающейся единообразным пространственным расположением антигенов относительно вирусоподобной частицы. В одном из вариантов осуществления изобретения повторяющаяся организация может представлять собой геометрическую организацию. В некоторых вариантах осуществления изобретения такие антигены, сшитые с ВПЧ РНК содержащих фагов, являются типичными и предпочтительными примерами приемлемых упорядоченных и повторяющихся наборов антигенов, которые, кроме того, имеют точно повторяющиеся паракристаллические схемы расположения антигенов, предпочтительно с интервалами от 1 до 30 нм, предпочтительно от 2 до 15 нм, еще более предпочтительно от 2 до 10 нм и еще более предпочтительно от 2 до 8 нм, и наиболее предпочтительно от 1,6 до 7 нм.

Упакованная: Понятие «упакованная» в контексте настоящего описания относится к состоянию полианионной макромолекулы или иммуностимулирующих субстанций относительно ВПЧ. Понятие «упакованная» в контексте настоящего описания включает связывание, которое может быть ковалентным, например, путем химического сочетания, или нековалентным, например, путем ионных взаимодействий, гидрофобных взаимодействий, водородных связей и т.д. Понятие «упакованная» относится к включению или частичному включению полианионной макромолекулы. Так, полианионную макромолекулу или иммуностимулирующие субстанции можно включать в ВПЧ без осуществления фактического связывания, в частности с помощью ковалентной связи. В предпочтительных вариантах осуществления изобретения по меньшей мере одну полианионную макромолекулу или иммуностимулирующие субстанции упаковывают внутрь ВПЧ, наиболее предпочтительно нековалентно.

Спейсер: Понятие «спейсер», а также эквивалентное ему понятие «аминокислотный спейсер» в контексте настоящего описания относится к участку аминокислотной последовательности, который состоит не более чем из 30 аминокислот и который связывает N-конец одной цепи с C-концом другой цепи Fe1 d1.

Вирусная частица: Понятие «вирусная частица» в контексте настоящего описания относится к морфологической форме вируса. Для некоторых типов вирусов она представляет собой геном, окруженный белковым капсидом; другие типы вирусов имеют дополнительные структуры (например, оболочки, хвосты и т.д.).

Вирусоподобная частица (ВПЧ) в контексте настоящего описания относится к нерепликативной или неинфекционной, предпочтительно нерепликативной и неинфекционной, вирусной частице, или относится к нереплекативной или неинфекционной, предпочтительно нерепликативной и неинфекционной, структуре, напоминающей вирусную частицу, предпочтительно капсид вируса. Понятие «нерепликативный» в контексте настоящего описания обозначает отсутствие у генома, входящего в ВПЧ, способности к репликации. Понятие «неинфекционный» в контексте настоящего описания обозначает неспособность проникать в клетку-хозяина. Предпочтительно вирусоподобная частица, предлагаемая в изобретении, является нерепликативной и/или неинфекционной, поскольку у нее отсутствуют полностью или частично вирусный геном или функции генома. В одном из вариантов осуществления изобретения вирусоподобная частица представляет собой вирусную частицу, в которой вирусный геном инактивирован физически или химически. Как правило и более предпочтительно, у вирусоподобной частицы отсутствуют все или часть репликативных и инфекционных компонентов вирусного генома.

Вирусоподобная частица, предлагаемая в изобретении, может содержать нуклеиновую кислоту из генома, отличного от ее генома. Обычным и предпочтительным вариантом вирусоподобной частицы, предлагаемой в настоящем изобретении, является вирусный капсид, такой как вирусный капсид соответствующего вируса, бактериофага, предпочтительно РНК содержащего фага. Понятия «вирусный капсид» или «капсид» означают макромолекулярную структуру, состоящую из субъединиц вирусного белка. Как правило, она состоит из 60, 120, 180, 240, 300, 360 и более субъединиц вирусного белка. Как правило и предпочтительно, взаимодействия этих субъединиц приводят к формированию вирусного капсида или напоминающей вирусной капсид структуры с присущей ей повторяющейся организацией, при этом структура, как правило, является сферической или трубчатой. Например, капсиды РНК содержащих фагов или НбсАг (внутренний (коровый) антиген вируса гепатита В) имеют сферическую форму, обладающую икосаэдральной симметрией. Понятие «капсидоподобная структура» в контексте настоящего описания относится к макромолекулярной структуре, состоящей из субъединиц вирусного белка, которая имеет морфологическое строение, сходное с капсидом, как он определен выше, но не имеет характерного симметричного строения, сохраняя при этом достаточную упорядоченность и частоту встречаемости.

Одним из общих признаков вирусной частицы и вирусоподобной частицы является высокий уровень упорядоченности и повторяющаяся структура их субъединиц.

Вирусоподобная частица РНК содержащего фага: В контексте настоящего описания понятие «вирусоподобная частица РНК содержащего фага» относится к вирусоподобной частице, содержащей или предпочтительно практически состоящей

или состоящей из оболочечных белков, их мутантов или фрагментов РНК содержащего фага. Кроме того, вирусоподобная частица РНК содержащего фага, имея структуру РНК содержащего фага, является нерепликативной или неинфекционной, и, как правило, у нее отсутствуют ген или гены, кодирующие комплекс репликации РНК содержащего фага, и, как правило, она лишена также гена или генов, кодирующих белок или белки, которые ответственны за связывание вируса с хозяином или за проникновение в хозяина. Однако под это определение подпадают также вирусоподобные частицы РНК-овых фагов, в которых вышеупомянутый(ые) ген или гены еще присутствуют, но являются неактивными, и вследствие этого такие частицы также представляют собой нерепликативные и неинфекционные вирусоподобные частицы РНК содержащего фага.

Предпочтительные ВПЧ, полученные из РНК-овых фагов, обладают икосаэдральной симметрией и состоят из 180 субъединиц. В контексте настоящего описания понятие «субъединица» и «мономер» используют взаимозаменяемо, и они являются эквивалентными. В контексте настоящего описания понятие «РНК содержащий фаг» и понятие «РНК содержащий бактериофаг» используют взаимозаменяемо.

Предпочтительными методами, с помощью которых вирусоподобную частицу РНК содержащего фага можно сделать нерепликативной и/или неинфекционной являются физическая, химическая инактивация, такая как УФ-облучение или обработка формальдегидом, как правило и предпочтительно, методы генной инженерии.

Один или несколько: В контексте настоящего описания упоминание единственного числа может обозначать «по меньшей мере один» или «один или несколько», если не указано иное.

Идентичность аминокислотных последовательностей полипептидов можно определять общепринятым методом с помощью известных компьютерных программ, таких как программа Bestfit. При использовании программы Bestfit или любой другой программы для сравнительного анализа последовательностей, предпочтительно при использовании программы Bestfit, для решения вопроса о том, идентична ли конкретная последовательность, например, на 95%, аминокислотной последовательности, с которой проводят сравнение, параметры устанавливают так, чтобы процент идентичности рассчитывать для полноразмерной аминокислотной последовательности, с которой проводят сравнение, и при этом допускается наличие «брешей» в гомологии вплоть до 5% от общего количества аминокислотных остатков в последовательности, с которой проводят сравнение. Вышеуказанный метод определения процента идентичности полипептидов применим для всех белков, полипептидов или их фрагментов, описанных в настоящем изобретении.

Согласно изобретению считается, что антитела специфически связываются, если их связывание с антигеном характеризуется аффинностью связывания (K_a) 10^6 M^{-1} или более, предпочтительно 10^7 M^{-1} или более, более предпочтительно 10^8 M^{-1} или более, и наиболее предпочтительно 10^9 M^{-1} или более. Обычный специалист в данной области легко может определять аффинность антител (например, с помощью анализа Скэтчарда).

Настоящее изобретение относится к композициям, предлагаемым в изобретении, содержащим: (а) коронную частицу, которая несет по меньшей мере один первый сайт присоединения, где коронная частица представляет собой вирусоподобную частицу (ВПЧ) или вирусную частицу и (б) по меньшей мере один антиген, который несет по меньшей мере один второй сайт присоединения, где по меньшей мере один антиген представляет собой белок Fe1 d1 или фрагмент Fe1 d1, и где (а) и (б) ковалентно

связаны с помощью по меньшей мере одного первого и по меньшей мере одного второго сайта присоединения.

Предпочтительно белок Fe1 d1 или фрагмент Fe1 d1 связаны так, чтобы формировать упорядоченный и повторяющийся набор антиген-ВПЧ. В
5 предпочтительных вариантах осуществления изобретения по меньшей мере 20, предпочтительно по меньшей мере 30, более предпочтительно по меньшей мере 60, еще более предпочтительно по меньшей мере 120 и еще более предпочтительно по меньшей мере 180 единиц белка Fe1 d1 или фрагмента Fe1 d1 связаны с коровой
10 частицей.

В качестве ВПЧ или вирусной частицы, предлагаемой в изобретении, можно использовать любой вирус, известный в данной области, который обладает упорядоченной и повторяющейся структурой. Примеры ДНК содержащих или РНК
15 содержащих вирусов, оболочечный или капсидный белок которых можно применять для получения ВПЧ, описаны в WO 2004/009124 на странице 25, строки 10-21, на странице 26, строки 11-28 и со страницы 28, строка 4, до страницы 31, строка 4. Указанный документ включен в настоящее описание в качестве ссылки.

Вирус или вирусоподобную частицу можно получать и очищать из зараженной
20 вирусом клеточной культуры. Полученный в результате вирус или вирусоподобная частица, предназначенные для приготовления вакцины, должны предпочтительно быть нерепликативными или неинфекционными, более предпочтительно нерепликативными и неинфекционными. Общепринятыми методами для этой цели
25 являются УФ-облучение, химическая обработка, например формальдегидом или хлороформом.

В одном из предпочтительных вариантов осуществления изобретения коровая частица представляет собой вирусную частицу, и предпочтительно вирусная частица
30 представляет собой вирусную частицу бактериофага, и предпочтительно также бактериофаг представляет собой РНК содержащий фаг, и еще более предпочтительно РНК содержащий фаг представляет собой РНК содержащий фаг, выбранный из Q β , fr, GA или AP205.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения коровая частица представляет собой ВПЧ. В другом предпочтительном варианте осуществления
35 изобретения ВПЧ представляет собой рекомбинантную ВПЧ. Почти все широко известные вирусы были секвенированы, и эти данные доступны научной общественности. Специалист в данной области легко может идентифицировать ген, кодирующий оболочечный белок, получение ВПЧ с помощью рекомбинантной
40 экспрессии оболочечного белка в хозяине является общеизвестным для специалистов в данной области.

В одном из предпочтительных вариантов осуществления изобретения вирусоподобная частица содержит или в другом варианте состоит из
45 рекомбинантных белков, их мутантов или фрагментов вируса, выбранного из группы, включающей: а) РНК содержащие фаги; б) бактериофаги; в) вирус гепатита В, предпочтительно его капсидный белок (Ulrich и др., Virus Res. 50, 1998, сс.141-182) или его поверхностный белок (WO 92/11291); г) вирус кори (Warnes и др., Gene 160, 1995, сс.173-178); д) вирус Синдбис; е) ротавирус (US 5071651 и US 5374426); ж) вирус
50 ящура (Twomey и др., Vaccine 13, 1995, сс.1603-1610); з) вирус Норвалка (Jiang X. и др., Science 250, 1990, сс.1580-1583; Matsui S.M. и др., J. Clin. Invest. 87, 1991, сс.1456-1461) и) альфавирус; к) ретровирус, предпочтительно его белок GAG (WO 96/30523); л) ретротранспозон Ty, предпочтительно белок p1; м) вирус человеческой

папилломы (WO 98/15631); н) вирус полиомы; о) вирус табачной мозаики; и п) вирус домашних стад (Flock House Virus).

В другом предпочтительном варианте осуществления изобретения ВПЧ содержит или состоит более чем из одной последовательности, предпочтительно из двух
5 аминокислотных последовательностей рекомбинантных белков, их мутантов или фрагментов. ВПЧ, которая содержит или состоит более чем из одной аминокислотной последовательности, в контексте настоящего описания обозначают как мозаичная ВПЧ.

Понятие «фрагмент рекомбинантного белка» или понятие «фрагмент
10 оболочечного белка» в контексте настоящего описания относится к полипептиду, длина которого составляет по меньшей мере 70%, предпочтительно по меньшей мере 80%, более предпочтительно по меньшей мере 90%, еще более предпочтительно по меньшей мере 95% от длины рекомбинантного белка или
15 оболочечного белка дикого типа соответственно, и который предпочтительно сохраняет способность формировать ВПЧ. Предпочтительно фрагмент получают с помощью по меньшей мере одной внутренней делеции, по меньшей мере одного укорочения или по меньшей мере одной их комбинации. Понятие «фрагмент
20 рекомбинантного белка» или «фрагмент оболочечного белка» относится также к полипептиду, аминокислотная последовательность которого идентична по меньшей мере на 80%, предпочтительно на 90%, еще более предпочтительно на 95% аминокислотной последовательности «фрагмента рекомбинантного белка» или «фрагмента оболочечного белка» соответственно, как они определены выше, и
25 который предпочтительно обладает способностью к сборке с образованием вирусоподобной частицы.

Понятие «мутантный рекомбинантный белок» или понятие «мутант
рекомбинантного белка», которые в настоящем описании используют
30 взаимозаменяемо, или понятие «мутантный оболочечный белок» или понятие «мутант оболочечного белка», которые в настоящем описании используют взаимозаменяемо, относится к полипептиду, аминокислотная последовательность которого выведена из рекомбинантного белка или оболочечного белка дикого типа
35 соответственно, аминокислотная последовательность которого по меньшей мере на 80%, предпочтительно по меньшей мере на 85%, 90%, 95%, 97% или 99% идентична последовательности дикого типа, и предпочтительно сохраняет способность к сборке с образованием ВПЧ.

В одном из предпочтительных вариантов осуществления изобретения
40 вирусоподобная частица, предлагаемая в изобретении, представляет собой вирус гепатита В. Получение вирусоподобных частиц гепатита В описано среди прочего в WO 00/32227, WO 01/85208 и WO 01/056905. Все три документа специально включены в настоящее описание в качестве ссылки. Другие варианты НВсАg, пригодные для воплощения на практике настоящего изобретения, описаны на
45 страницах 34-39 WO 01/056905.

Еще в одном предпочтительном варианте осуществления изобретения остаток
лизина интродуцируют в полипептид НВсАg с целью опосредования связывания Fe1
d1, предлагаемого в изобретении, с ВПЧ НВсАg. В предпочтительных вариантах
50 осуществления изобретения ВПЧ и композиции, предлагаемые в изобретении, получают с использованием НВсАg, который содержит или в другом варианте состоит из аминокислот 1-144 или 1-149, 1-185 SEQ ID NO:20, которая модифицирована, в результате чего аминокислоты в положениях 79 и 80 заменены

пептидом, имеющим аминокислотную последовательность Gly-Gly-Lys-Gly-Gly. Эта модификация изменяет SEQ ID NO:20 на SEQ ID NO:21. В других предпочтительных вариантах осуществления изобретения остатки цистеина в положениях 48 и 110 SEQ ID NO:21 или ее соответствующих фрагментах, предпочтительно 1-144 или 1-149, 5 заменены в результате мутации на серин. Изобретение относится также к композициям, содержащим мутанты коревого белка вируса гепатита В, которые имеют вышеуказанные аминокислотные замены. Изобретение относится также к композициям и вакцинам соответственно, содержащим полипептиды HBsAg, 10 которые содержат или в другом варианте состоят из аминокислотных последовательностей, которые по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 95%, 97% или 99% идентичны SEQ ID NO:21.

В одном из предпочтительных вариантов осуществления изобретения вирусоподобная частица, предлагаемая в изобретении, содержит, практически 15 состоит или в другом варианте состоит из рекомбинантных оболочечных белков, их мутантов или фрагментов РНК содержащего фага. Предпочтительно РНК содержащий фаг выбирают из группы, включающей а) бактериофаг Qд.; б) бактериофаг R17; в) бактериофаг fr; г) бактериофаг GA; д) бактериофаг SP; е) 20 бактериофаг MS2; ж) бактериофаг M11; з) бактериофаг MX1; и) бактериофаг NL95; к) бактериофаг f2; л) бактериофаг PP7 и м) бактериофаг AP205.

В одном из предпочтительных вариантов осуществления изобретения композиция содержит оболочечный белок, его мутанты или фрагменты РНК содержащих фагов, где оболочечный белок имеет аминокислотную последовательность, выбранную из 25 группы, включающей: (а) SEQ ID NO:1, относящуюся к CP Qβ; (б) смесь SEQ ID NO:1 и SEQ ID NO:2 (относящуюся к белку A1 Qβ); (в) SEQ ID NO:3; (г) SEQ ID NO:4; (д) SEQ ID NO:5; (е) SEQ ID NO:6, (ж) смесь SEQ ID NO:6 и SEQ ID NO:7; (з) SEQ ID NO:8; (и) SEQ ID NO:9; (к) SEQ ID NO:10; (л) SEQ ID NO:11; (м) SEQ ID NO:12; (н) SEQ ID NO:13 и (о) SEQ ID NO:14. 30

В одном из предпочтительных вариантов осуществления изобретения ВПЧ представляет собой мозаичную ВПЧ, которая содержит или в другом варианте состоит более чем из одной аминокислотной последовательности, предпочтительно 35 из двух аминокислотных последовательностей, оболочечных белков, их мутантов или фрагментов РНК содержащего фага.

В наиболее предпочтительном варианте осуществления изобретения ВПЧ содержит или в другом варианте состоит из двух различных оболочечных белков РНК содержащего фага, где эти два оболочечных белка имеют аминокислотную 40 последовательность SEQ ID NO:1 и SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:6 и SEQ ID NO:7.

В других предпочтительных вариантах осуществления изобретения вирусоподобная частица, предлагаемая в изобретении, содержит или в другом варианте практически состоит или еще в одном варианте состоит из оболочечных 45 белков, их фрагментов или мутантов РНК содержащего бактериофага Qβ, fr, AP205 или GA. В одном из предпочтительных вариантов осуществления изобретения ВПЧ представляет собой ВПЧ РНК содержащего бактериофага, предпочтительно РНК содержащего бактериофага Qβ, fr, AP205 или GA.

В одном из предпочтительных вариантов осуществления изобретения ВПЧ, предлагаемая в изобретении, представляет собой ВПЧ РНК содержащего фага Qβ. 50 Капсид или вирусоподобная частица фага Qβ обладает икосаэдральной фагоподобной капсидной структурой с диаметром 25 нм и квазисимметрией T=3. Капсид содержит 180 копий оболочечного белка, которые связаны в ковалентные

пентамеры и гексамеры дисульфидными мостиками (Golmohammadi R. и др., Structure 4, 1996, сс.543-5554), что позволяет получать обладающий высокой стабильностью капсид Q β . Однако капсиды или ВПЧ, полученные из рекомбинантного оболочечного белка Q β , могут содержать субъединицы, не связанные или не полностью связанные дисульфидными мостиками с другими субъединицами капсида. Капсид или ВПЧ Q β обладает также необычной устойчивостью к органическим растворителям и денатурирующим агентам. При создании изобретения неожиданно было установлено, что ДМСО и ацетонитрил при их применении в концентрациях порядка 30% и гуанидиний в концентрациях порядка 1М не оказывают воздействия на стабильность капсида. Высокая стабильность капсида или ВПЧ Q β является имеющим преимущество признаком, в частности при их применении для иммунизации и вакцинации млекопитающих и человека согласно настоящему изобретению.

Другие предпочтительные согласно настоящему изобретению вирусоподобные частицы РНКовых фагов, в частности Q β и fr, описаны в WO 02/056905, содержание которой полностью включено в настоящее описание в качестве ссылки. Конкретно в примере 18 WO 02/056905 дано подробное описание получения ВПЧ из Q β .

В другом предпочтительном варианте осуществления изобретения ВПЧ, предлагаемая в изобретении, представляет собой ВПЧ РНК содержащего фага AP205. Компетентные в отношении сборки мутантные формы ВПЧ AP205, содержащие оболочечный белок AP205 с заменой пролина в положении 5 аминокислотной последовательности на треонин, можно применять также для воплощения на практике изобретения, и они являются предпочтительными дополнительными вариантами осуществления изобретения. В WO 2004/007538, в частности в примере 1 и в примере 2, описан метод получения ВПЧ, содержащих оболочечные белки AP205, и в частности их экспрессия и очистка. WO 2004/007538 включена в настоящее описание в качестве ссылки. ВПЧ AP205 обладают высокой иммуногенностью и их можно связывать с Fe1 d1, предлагаемым в изобретении, как правило и предпочтительно, для получения конструкций вакцины, презентующих Fe1 d1, предлагаемый в изобретении, ориентированный упорядоченным образом. При такой презентации Fe1 d1, предлагаемого в изобретении, продуцируется высокий титр антител, что свидетельствует о том, что связанные Fe1 d1, предлагаемые в изобретении, доступны для взаимодействия с молекулами антитела и обладают иммуногенностью.

В одном из предпочтительных вариантов осуществления изобретения ВПЧ, предлагаемая в изобретении, содержит или состоит из мутантного оболочечного белка вируса, предпочтительно РНК содержащего фага, где мутантный оболочечный белок РНК содержащего фага модифицирован путем удаления по меньшей мере одного остатка лизина посредством замены и/или посредством делеции. В другом предпочтительном варианте осуществления изобретения ВПЧ, предлагаемая в изобретении, содержит или состоит из мутантного оболочечного белка вируса, предпочтительно РНК содержащего фага, где мутантный оболочечный белок РНК содержащего фага модифицирован посредством добавления по меньшей мере одного остатка лизина путем замены или путем инсерции. Делеция, замена или добавление по меньшей мере одного остатка лизина позволяет варьировать уровень сочетания, т.е. количество Fe1 d1, предлагаемого в изобретении, на одну субъединицу ВПЧ вируса, предпочтительно РНКовых фагов, в частности, для удовлетворения и соответствия требованиям, предъявляемым к

вакцине.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления изобретения композиции и вакцины, предлагаемые в изобретении, имеют антигенную плотность от 0,5 до 4,0. Понятие «антигенная плотность» в контексте настоящего описания относится к
 5 среднему количеству Fe1 d1, предлагаемого в изобретении, которое связано с субъединицей, и предпочтительно с оболочечным белком ВПЧ и предпочтительно ВПЧ РНК содержащего фага. Так, это значение рассчитывают как среднее для всех субъединиц или мономеров ВПЧ, предпочтительно ВПЧ РНК содержащего фага, в
 10 композиции или вакцинах, предлагаемых в изобретении.

ВПЧ или капсиды оболочечного белка Q β имеют определенное количество остатков лизина на своей поверхности, характеризующихся определенной топологией, которая отличается тем, что три остатка лизина направлены внутрь
 15 капсида и взаимодействуют с РНК, а четыре других остатка лизина направлены кнаружи капсида. Предпочтительно по меньшей мере один первый сайт присоединения представляет собой остаток лизина, направленный кнаружи или расположенный снаружи ВПЧ.

Согласно настоящему изобретению можно применять мутанты Q β , в которых
 20 находящиеся на поверхности (презентированные) остатки лизина заменены остатком аргинина. Таким образом, в еще одном предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения вирусоподобная частица содержит, практически состоит или в еще одном варианте состоит из мутантных оболочечных белков Q β .
 25 Предпочтительно эти мутантные оболочечные белки содержат или в другом варианте состоят из аминокислотных последовательностей, выбранных из группы, включающей а) Q β -240 (SEQ ID NO:15, Lys13-Arg SEQ ID NO:1); б) Q β -243 (SEQ ID NO:16, Asn10-Lys SEQ ID NO:1); в) Q β -250 (SEQ ID NO:17, Lys2-Arg SEQ ID NO:1); г) Q β -251 (SEQ ID NO:18, Lys16-Arg SEQ ID NO:1); и д) Q β -259" (SEQ ID NO:19, Lys2-Arg,
 30 Lys16-Arg SEQ ID NO:1). Конструирование, экспрессия и очистка вышеуказанных мутантных оболочечных белков Q β , ВПЧ и капсидов соответственно из мутантного оболочечного белка Q β описаны в WO 02/056905, в частности в примере 18 вышеуказанной заявки.

В другом предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения
 35 вирусоподобная частица содержит или в другом варианте практически состоит, или еще в одном варианте состоит из мутантных оболочечных белков Q β или их мутантов или фрагментов и соответствующего белка A1. В другом предпочтительном варианте осуществления изобретения вирусоподобная частица
 40 содержит или в другом варианте практически состоит, или еще в одном варианте состоит из мутантного оболочечного белка, который имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:15, 16, 17, 18 или 19, и соответствующего белка A1.

Кроме того, обнаружены другие оболочечные белки РНКовых фагов, которые
 45 также обладают способностью к самосборке при экспрессии в бактериальном хозяине (Kastelein R.A. и др., Gene 23, 1983, cc.245-254, Kozlovskaya T.M. и др., Dokl. Akad. Nauk SSSR 287, 1986, cc.452-455, Adhin M.R. и др., Virology 170, 1989, cc.238-242 (1989), Priano C. и др., J. Mol. Biol. 249, 1995, cc.283-297). Выявлены конкретные
 50 биологические и биохимические свойства GA (Ni CZ. и др., Protein Sci. 5, 1996, cc.2485-2493. Tars K. и др., J. Mol.Biol. 271, 1997, cc.759-773) и fr (Pushko P. и др., Prot. Eng. 6, 1993, cc.883-891; Liljas L. и др., J Mol. Biol. 244, 1994, cc.279-290). Определена кристаллическая структура некоторых РНКовых бактериофагов (Golmohammadi R. и

др., Structure 4, 1996, сс.543-554). На основе этой информации можно идентифицировать находящиеся на поверхности остатки и благодаря этому оболочечные белки РНКовых фагов можно модифицировать таким образом, чтобы один или несколько реакционноспособных аминокислотных остатков можно было встраивать путем инсерции или замены. Другим преимуществом ВПЧ, выведенных из РНКовых фагов, является их высокий уровень экспрессии в бактериях, в частности в *E.coli*, что позволяет получать большие количества материала с приемлемыми затратами.

В одном из предпочтительных вариантов осуществления изобретения композиция, предлагаемая в изобретении, содержит по меньшей мере один антиген, где указанный по меньшей мере один антиген представляет собой белок Fe1 d1.

В одном из предпочтительных вариантов осуществления изобретения белок Fe1 d1 содержит или в другом варианте состоит из встречающегося в естественных условиях Fe1 d1. Первичная структура цепи 1 представлена в последовательности SEQ ID NO:22. Известными из литературы вариантами цепи 1 являются Lys29-Arg или Asn, Val33-Ser, Val60-Leu. Первичная структура цепи 2 представлена в последовательности SEQ ID NO:23, 25 или 26. Известными из литературы вариантами цепи 2 являются варианты SEQ ID NO:23, 25 или 26 Cys7-Phe, Phe15-Thr, Asn19-Ser, Gly20-Leu, Ile55-Val, Arg57-Lys, Val58-Phe. Другими вариантами цепи 2 являются Glu69-Val, Tyr70-Asp, Met72-Thr, Gln-77-Glu и Asn86-Lys (вариант SEQ ID NO:25); Met74-Thr, Gln79-Glu и Asn88-Lys (вариант SEQ ID NO:23) (Griffith I.J. и др., Gene 113, 1992, сс.263-268); Morgenstern J.P. и др., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 88, 1991, сс.9690-9694); Duffort O.A. и др., 1 Mol. Immunol. 28, 1991, сс.301-309; Leiternann K. и др., J. Allergy Clin. Immunol. 74, 1984, сс.147-153; Kristensen A. K и др., Biol Chem 378, 1997, сс.899-908). Встречающийся в естественных условиях Fe1 d1 получают очисткой, например, из кошачьей слюны, кошачьей перхоти, домашней пыли жилищ, в которых обитают кошки, и т.д.

В одном из предпочтительных вариантов осуществления изобретения Fe1 d1, предлагаемый в изобретении, представляет собой рекомбинантный белок Fe1 d1 или рекомбинантный фрагмент Fe1 d1. Понятия «рекомбинантный белок Fe1 d1» или «рекомбинантный фрагмент Fe1 d1» в контексте настоящего описания относятся к белку Fe1 d1 или фрагменту Fe1 d1, полученному с помощью процесса, который включает по меньшей мере одну стадию применения технологии рекомбинантной ДНК. Понятия «рекомбинантный белок Fe1 d1 d1» или «рекомбинантный фрагмент Fe1 d1» и «полученный путем рекомбинации белок Fe1 d1 d1» или «полученный путем рекомбинации фрагмент Fe1 d1» в контексте настоящего описания используют взаимозаменяемо, и они имеют идентичное значение. Рекомбинантный белок Fe1 d1 d1 или его фрагмент можно получать в любых прокариотических системах экспрессии, таких как *E.coli* (WO 2004/094639), или эукариотических системах экспрессии, таких как бакуловир (WO 00/20032). Seppala с соавторами описали одновременную экспрессию цепи 1 и цепи 2 Fe1 d1 при использовании дицистронного промотора в бакуловире (J. Biol. Chem., ноябрь 2004 г.). Полученный рекомбинантно белок Fe1 d1 или его фрагмент может быть гликозилированным или негликозилированным в зависимости от применяемой для получения рекомбинантного белка клетки-хозяина.

В одном из вариантов осуществления изобретения рекомбинантный белок Fe1 d1 содержит или в другом варианте состоит из цепи 1 Fe1 d1 и цепи 2 Fe1 d1, где цепь 1 Fe1 d1 ассоциирует с цепью 2 Fe1 d1 только с помощью нековалентной связи, такой

как гидрофобные взаимодействия.

В одном из предпочтительных из вариантов осуществления изобретения рекомбинантный белок Fe1 d1 содержит или в другом варианте состоит из цепи 1 Fe1 d1 и цепи 2 Fe1 d1, где цепь 1 Fe1 d1 ассоциируют с цепью 2 Fe1 d1 с помощью по меньшей мере одной ковалентной связи. В одном из предпочтительных вариантов осуществления изобретения по меньшей мере одна ковалентная связь представляет собой непептидную связь, где непептидная связь представляет собой дисульфидный мостик, или где предпочтительно непептидная связь представляет собой дисульфидный мостик. Например, цепь 1 Fe1 d1 и цепь 2 Fe1 d1 можно экспрессировать по отдельности и затем объединять в условиях, которые обеспечивают формирование правильного дисульфидного мостика, таких как метод решуффлинга (перестановки). В другом варианте цепь 1 Fe1 d1 и цепь 2 Fe1 d1 можно экспрессировать одновременно в одном хозяине, например путем клонирования генов, кодирующих цепь 1 Fe1 d1 и цепь 2 Fe1 d1 соответственно, под контролем двух промоторов в одной плазмиде. В эукариотической системе экспрессии цепь 1 Fe1 d1 и цепь 2 Fe1 d1 можно транскрибировать в одной мРНК и транслировать по отдельности с использованием внутреннего рибосомального сайта проникновения (IRES).

В одном из предпочтительных вариантов осуществления изобретения белок Fe1 d1 содержит или в другом варианте состоит из слитого белка, где слитый белок содержит цепь 1 Fe1 d1 и цепь 2 Fe1 d1. В одном из предпочтительных вариантов осуществления изобретения цепь 1 Fe1 d1 и цепь 2 Fe1 d1 сливают непосредственно с помощью одной пептидной связи, которая соединяет N-конец одной цепи с С-концом другой цепи. В другом предпочтительном варианте осуществления изобретения цепь 1 Fe1 d1 и цепь 2 Fe1 d1 сливают через спейсер, который связывает N-конец одной цепи с С-концом другой цепи. Предпочтительно спейсер состоит из 1-30, предпочтительно 1-25, предпочтительно 1-20, предпочтительно 1-15, предпочтительно 1-9, предпочтительно 1-5, предпочтительно 1-3 аминокислот. В другом варианте спейсер состоит из 10-30, предпочтительно 10-25, более предпочтительно 10-20, более предпочтительно 13-20, более предпочтительно 15-20, более предпочтительно 13-17, более предпочтительно 15-17 аминокислот. Предпочтительно спейсер имеет аминокислотную последовательность, состоящую из 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 аминокислотных остатков. В одном из предпочтительных вариантов осуществления изобретения спейсер содержит 15 аминокислот. В другом предпочтительном варианте осуществления изобретения спейсер представляет собой (GGGGS)₃.

В одном из предпочтительных вариантов осуществления изобретения слитый белок содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, включающей: (а) SEQ ID NO:24; (б) SEQ ID NO:54; (в) SEQ ID NO:55; (г) SEQ ID NO:56 и (д) SEQ ID NO:57.

В одном из предпочтительных вариантов осуществления изобретения цепь 2 Fe1 d1 сливают через ее С-конец с N-концом цепи 1 Fe1 d1 либо непосредственно, либо через спейсер. В одном из предпочтительных вариантов осуществления изобретения белок Fe1 d1 содержит или в другом варианте состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:24.

В WO 2004/094639 описан рекомбинантный складчатый Fe1 d1, молекулярные и биологические свойства, которого аналогичны встречающейся в естественных условиях копии, и специфические синтетические гены, кодирующие непосредственное

слияние N-конца цепи 2 Fe1 d1 с цепью 1. Экспрессия в E.coli приводила к получению нековалентно ассоциированного гомодимера с кажущейся молекулярной массой 30 кДа, которую определяли с помощью гель-филтрации, каждая субъединица с молекулярной массой 19177 Да, для которой характерна дисульфидная структура, идентична субъединице, присутствующей во встречающемся в естественных условиях Fe1 d1, и у встречающегося в естественных условиях и рекомбинантного Fe1 d1 обнаружена идентичная складчатость. Рекомбинантный Fe1 d1 взаимодействует с IgE из сыворотки пациентов, страдающих аллергией на кошек, аналогично встречающемуся в естественных условиях Fe1 d1. Таким образом, этот слитый белок Fe1 d1 имитирует антигенные свойства встречающегося в естественных условиях Fe1 d1.

В одном из предпочтительных вариантов осуществления изобретения цепь 1 Fe1 d1 сливают через ее С-конец с N-концом цепи 2 Fe1 d1 либо непосредственно, либо через спейсер.

В одном из предпочтительных вариантов осуществления изобретения цепь 1 Fe1 d1 содержит или в другом варианте состоит из последовательности SEQ ID NO:22 или гомологичной ей последовательности, где гомологичная последовательность идентична SEQ ID NO:22 более чем на 80%, предпочтительно более чем на 90% или еще более предпочтительно более чем на 95%.

В одном из предпочтительных вариантов осуществления изобретения цепь 2 Fe1 d1 содержит или в другом варианте состоит из последовательности SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:25 или SEQ ID NO:26 или гомологичной ей последовательности, где гомологичная последовательность идентична SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:25 или SEQ ID NO:26 более чем на 80%, предпочтительно более чем на 90% и еще более предпочтительно более чем на 95%.

В одном из предпочтительных вариантов осуществления изобретения белок Fe1 d1 представляет собой рекомбинантный белок Fe1 d1, в котором по меньшей мере одна дисульфидная связь разрушена, предпочтительно путем мутации, более предпочтительно путем консервативной замены, такой как Cys на Ser.

Идентифицированы три находящихся внутри цепи дисульфидных мостика, связывающие два пептида во встречающемся в естественных условиях Fe1 d1, т.е.

Cys3(1)-Cys73(2), Cys44(1)-48Cys(2) и Cys70(1)-Cys7(2), что позволяет предположить наличие антипараллельной ориентации пептидов Fe1 d1 (Kristensen A. K. и др., Biol Chem 378, 1997, сс.899-908). В одном из предпочтительных вариантов осуществления изобретения разрушают один такой дисульфидный мостик в белке Fe1 d1. В другом предпочтительном варианте осуществления изобретения разрушают два таких дисульфидных мостика в белке Fe1 d1. И еще в одном из предпочтительных вариантов осуществления разрушают все три таких дисульфидных мостика в белке Fe1 d1. В одном из предпочтительных вариантов осуществления изобретения Cys70 цепи 1 либо изымают путем делеции, либо подвергают мутации. В другом предпочтительном варианте осуществления изобретения Cys73 цепи изымают путем делеции или подвергают мутации. В одном из предпочтительных вариантов осуществления изобретения белок Fe1 d1 представляет собой слитый белок, который содержит цепь 1 Fe1 d1 и цепь 2 Fe1 d1, слитые либо непосредственно, либо через спейсер, в которых разрушены все три указанных дисульфидных мостика. В одном из предпочтительных вариантов осуществления изобретения белок Fe1 d1 содержит или в другом варианте состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:24, 55 или 57, в которой по меньшей мере один,

предпочтительно по меньшей мере три, еще более предпочтительно по меньшей мере пять остатков цистеина удалены в результате замены или делеции.

В одном из предпочтительных вариантов осуществления изобретения антиген, предлагаемый в изобретении, содержит или в другом варианте состоит из
 5 фрагмента Fe1 d1. Известно, что для проявления иммуногенности не всегда требуется полноразмерный белок и, как правило, белок содержит более одного антигенного эпитопа, т.е. антигенной детерминанты. Может оказаться достаточным, если фрагмент или короткий пептид содержит по меньшей мере одну антигенную
 10 детерминанту, которая может иммуноспецифически связываться с антителом или Т-клеточным рецептором в контексте молекулы ГКС. Антигенную детерминанту или детерминанты можно определять многочисленными методами, известными специалисту в данной области. Это можно осуществлять путем сравнительного анализа первичной структуры последовательности и предсказания структуры.
 15 Например, можно предсказывать возможные α -спирали, обороты спирали, меж- и внутрицепочечные дисульфидные мостики и т.д., с помощью программы, такой как Rasmol. Можно предсказывать также последовательности, погруженные в молекулу, или последовательности, находящиеся на поверхности молекулы.
 20 Последовательности, находящиеся на поверхности молекулы, наиболее вероятно содержат встречающуюся(иеся) в естественных условиях антигенную(ые) детерминанту(ы), и поэтому их можно применять для индукции терапевтических антител. После определения поверхностных пептидов антигенную детерминанту внутри этой последовательности можно определять также, например, методом
 25 истощающего мутагенеза (такого как аланинсканирующий мутагенез, Cunningham B.C., Wells J.A., Science 244(4908), 2 июня 1989 г., сс.1081-1085). В целом, метод состоит в следующем: аминокислоты в рассматриваемой последовательности одну за другой заменяют путем мутации на алалин и аминокислоты, замена которых на
 30 алалин привела к соответствующему уменьшению связывания с антителом (образовавшимся в ответ на обработку последовательностью дикого типа) или полной потери способности к связыванию, рассматривают как вероятный компонент антигенной детерминанты. Другой метод определения антигенных(ой) детерминант(ы) заключается в создании перекрывающихся пептидов, которые
 35 простираются на полноразмерную последовательность Fe1 d1 (Geysen, PNAS, 81, 1984, сс.3998-4002 и Slootstra J. W. и др., Mol. Divers. 1, 1996, сс.87-96).

В одном из предпочтительных вариантов осуществления изобретения антиген, предлагаемый в изобретении, содержит или в другом варианте состоит по меньшей
 40 мере из одного, предпочтительно по меньшей мере из двух эпитопов Fe1 d, предпочтительно также по меньшей мере один эпитоп получают из цепи 1 Fe1 d1 и по меньшей мере один эпитоп получают из цепи 2 Fe1 d1.

Реактивные в отношении Т-клеток эпитопы Fe1 d1 картировали в целом белке Fe1 d1, и они известны в данной области техники, например, описаны в US 6120769,
 45 четвертый параграф столбца 14, в столбце 130 и 131 US6025162, содержание этих документов включено в настоящее описание в качестве ссылки. В предпочтительном варианте осуществления изобретения Т-клеточный эпитоп Fe1 d1 выбирают из группы, включающей: SEQ ID NO:27-32.

Настоящее изобретение относится также к способу получения композиции, предлагаемой в изобретении, заключающемуся в том, что (а) получают ВПЧ,
 50 которая несет по меньшей мере один первый сайт присоединения; (б) получают по меньшей мере один антиген, где антиген представляет собой белок Fe1 d1 или

фрагмент Fe1 d1, который несет по меньшей мере один второй сайт присоединения; и (в) объединяют ВПЧ и по меньшей мере один антиген с получением композиции, где по меньшей мере один антиген и ВПЧ связаны с помощью первого и второго сайтов присоединения. В предпочтительном варианте осуществления изобретения
 5 получение по меньшей мере одного антигена, т.е. белка Fe1 d1 или фрагмента Fe1 d1, который несет по меньшей мере один второй сайт присоединения, осуществляют с помощью экспрессии, предпочтительно экспрессии в бактериальной системе, предпочтительно в E.coli. Общепринятые метки, такие как His-метку, Мус-метку,
 10 добавляют для облегчения процесса очистки. При применении другого подхода конкретные фрагменты Fe1 d1 длиной не более 50 аминокислот можно получать с помощью химического синтеза.

В одном из предпочтительных вариантов осуществления изобретения ВПЧ, которая несет по меньшей мере один первый сайт присоединения, связывают с Fe1
 15 d1, предлагаемым в изобретении, с помощью по меньшей мере одного второго сайта присоединения по меньшей мере через одну пептидную связь. Ген, кодирующий Fe1 d1, предлагаемый в изобретении, предпочтительно фрагмент Fe1 d1, более предпочтительно фрагмент длиной не более 50 аминокислот, еще более
 20 предпочтительно длиной менее 30 аминокислот, лигируют в рамке считывания, либо путем встраивания внутрь, либо предпочтительно с N- или С-концом гена, который кодирует оболочечный белок ВПЧ. Варианты осуществления, касающиеся связывания антигена, предлагаемого в изобретении, с оболочечным белком, его мутантами или фрагментами, с оболочечным белком вируса, описаны в WO
 25 2004/009124 со с.62, строка 20 до с.68, строка 17 и включены в настоящее описание в качестве ссылки.

В одном из предпочтительных вариантов осуществления изобретения фрагмент Fe1 d1 сливают либо с N-, либо с С-концом оболочечного белка, его
 30 мутантов или фрагментов РНК содержащего фага AP205. В другом предпочтительном варианте осуществления изобретения слитый белок содержит также спейсер, где спейсер слит с оболочечным белком, его фрагментами или мутантами фага AP205 и фрагментом Fe1 d1.

В одном из предпочтительных вариантов осуществления настоящего изобретения композиция содержит или в другом варианте практически состоит из
 35 вирусоподобной частицы, которая несет по меньшей мере один первый сайт присоединения, связанный по меньшей мере с одним Fe1 d1, предлагаемым в изобретении, который несет по меньшей мере один второй сайт присоединения, с помощью по меньшей мере одной ковалентной связи, предпочтительно ковалентной
 40 связи, и которая представляет собой непептидную связь. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения первый сайт присоединения содержит или предпочтительно представляет собой аминокгруппу, предпочтительно аминокгруппу остатка лизина. В другом предпочтительном варианте осуществления
 45 настоящего изобретения второй сайт присоединения содержит или предпочтительно представляет собой сульфгидрильную группу, предпочтительно сульфгидрильную группу цистеина.

В наиболее предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения по меньшей мере один первый сайт присоединения представляет собой аминокгруппу,
 50 предпочтительно аминокгруппу лизина, а по меньшей мере один второй сайт присоединения представляет собой сульфгидрильную группу, предпочтительно сульфгидрильную группу цистеина.

В одном из предпочтительных вариантов осуществления изобретения Fe1 d1, предлагаемый в изобретении, связывают с ВПЧ с помощью химического перекрестного сшивания, как правило и предпочтительно, с помощью гетеробифункционального перекрестносшивающего агента. В предпочтительных вариантах осуществления изобретения гетеробифункциональный перекрестносшивающий агент содержит функциональную группу, которая может вступать во взаимодействие с предпочтительными первыми сайтами присоединения, т.е. аминок группой, предпочтительно с остатком(ами) лизина ВПЧ, и дополнительную функциональную группу, которая может вступать во взаимодействие с предпочтительным вторым сайтом присоединения, т.е. сульфгидрильной группой, предпочтительно присущей остатку(ам) цистеина или искусственно добавленной к Fe1 d1, предлагаемому в изобретении, и необязательно также обеспечивать его доступность для реакции путем восстановления. В данной области известно несколько гетеробифункциональных перекрестносшивающих агентов. Они представляют собой предпочтительные перекрестносшивающие агенты SMPH (сукцинимидил-6-[В-малеимидопропионамидо]гексаноат) (фирма Pierce), сульфо-MBS, сульфо-EMCS, сульфо-GMBS, сульфо-SIAB, сульфо-SMPB, сульфо-SMCC, SVSB, SIA и другие перекрестносшивающие агенты, которые выпускаются, например, фирмой Pierce Chemical Company, и они имеют одну функциональную группу, обладающую реакционной способностью в отношении аминок групп, и одну функциональную группу, обладающую реакционной способностью в отношении сульфгидрильных групп. Все указанные выше перекрестносшивающие агенты приводят к образованию амидной связи после реакции с аминок группой и тиозфирной связи с сульфгидрильными группами. Другой класс перекрестносшивающих агентов, которые можно применять для воплощения изобретения на практике, отличается тем, что при сшивании происходит введение дисульфидного мостика между антигеном и ВПЧ. Предпочтительные перекрестносшивающие агенты, принадлежащие к этому классу, представляют собой, например, SPDP и сульфо-LC-SPDP (фирма Pierce).

В предпочтительном варианте осуществления изобретения композиция, предлагаемая в изобретении, дополнительно содержит линкер. Создание второго сайта присоединения в Fe1 d1, предлагаемом в изобретении, осуществляют путем ассоциации линкера, который предпочтительно содержит по меньшей мере одну аминокислоту, пригодную в качестве второго сайта присоединения, предлагаемого в изобретении. Таким образом, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения линкер ассоциируют с Fe1 d1, предлагаемым в изобретении, с помощью по меньшей мере одной ковалентной связи, предпочтительно с помощью по меньшей мере одной, как правило, одной пептидной связи. Предпочтительно линкер содержит или в альтернативном варианте состоит из второго сайта присоединения. Предпочтительно линкер содержит или в другом варианте представляет собой второй сайт присоединения. В другом предпочтительном варианте осуществления изобретения линкер содержит сульфгидрильную группу, предпочтительно остатка цистеина. В другом предпочтительном варианте осуществления изобретения аминокислотный линкер представляет собой остаток цистеина.

Выбор линкера должен зависеть от природы Fe1 d1, предлагаемого в изобретении, от его биохимических свойств, таких как pI, распределение заряда и гликозилирование. В целом, предпочтительными являются пластичные

аминокислотные линкеры. В другом предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения линкер состоит из аминокислот, предпочтительно также линкер состоит максимум из 25, предпочтительно максимум из 20, более предпочтительно максимум из 15 аминокислот. В предпочтительных вариантах осуществления изобретения линкер выбирают из группы, включающей: (а) CGG; (б) N-концевой линкер гамма 1 (например, CGDKTHTSPP, SEQ ID NO:58); (в) N-концевой линкер гамма 3 (например, CGGPKPSTPPGSSGGAP, SEQ ID NO:69); (г) шарнирные области Ig; (д) N-концевые глициновые линкеры (например, GCGGGG, SEQ ID NO:59); (е) (G)kC(G)n, где n=0-12 и k=0-5; (ж) N-концевые глицин-сериновые линкеры ((GGGGS)n, n=1-3 с одним дополнительным остатком цистеина (например, SEQ ID NO:60, которая соответствует варианту, где n=1); (з) (G)kC(G)m(S)l(GGGGS)n, где n=0-3, k=0-5, m=0-10, l=0-2 (например, SEQ ID NO:61, которая соответствует варианту, где n=1, k=1, l=1 и m=1); (и) GGC; (к) GGC-NH₂; (л) С-концевой линкер гамма 1 (например, DKTHTSPPCG, SEQ ID NO:62); (м) С-концевой линкер гамма 3 (например, PKPSTPPGSSGGAPGGCG, SEQ ID NO:63); (н) С-концевые глициновые линкеры (GGGGCG, SEQ ID NO:64); (о) (G)nC(G)k, где n=0-12 и k=0-5; (п) С-концевые глицин-сериновые линкеры ((SGGGG)n, n=1-3 с одним дополнительным остатком цистеина (например, SEQ ID NO:65, которая соответствует варианту, где n=1)); (р) (G)m(S)l(GGGGS)n(G)oC(G)k, где n=0-3, k=0-5, m=0-10, l=0-2 и o=0-8 (например, SEQ ID NO:66, которая соответствует варианту, где n=1, k=1, l=1, o=1 и m=1). В еще одном предпочтительном варианте осуществления изобретения линкер добавляют к N-концу Fe1 d1, предлагаемого в изобретении. В другом предпочтительном варианте осуществления изобретения линкер добавляют к С-концу Fe1 d1, предлагаемого в изобретении.

Предпочтительными линкерами, предлагаемыми в изобретении, являются глициновые линкеры (G)n, дополнительно содержащие остаток цистеина в качестве второго сайта присоединения, такие как N-концевой глициновый линкер (GCGGGG) и С-концевой глициновый линкер (GGGGCG). В других предпочтительных вариантах осуществления изобретения линкеры представляют собой С-концевой глицин-лизиновый линкер (GGKKGC, SEQ ID NO:67) и N-концевой глицин-лизиновый линкер (CGKKGG, SEQ ID NO:68), GGCG, GGC или GGC-NH₂ («NH₂» обозначает группу, предназначенную для амидирования) на С-конце пептида или CGG на его N-конце. Как правило, глициновые остатки должны быть встроены между имеющими большой объем аминокислотами, а остаток цистеин следует применять в качестве второго сайта присоединения, для того, чтобы избегать возможной стерической помехи, связанной с объемной аминокислотой при реакции сочетания.

В одном из предпочтительных вариантов осуществления изобретения линкер сливают с N-концом белка Fe1 d1 или фрагмента Fe1 d1. В другом предпочтительном варианте осуществления изобретения линкер представляет собой GCGG. В другом предпочтительном варианте осуществления изобретения линкер сливают с С-концом белка Fe1 d1 или фрагмента Fe1 d1. В следующем предпочтительном варианте осуществления изобретения линкер представляет собой GGC. В случае, когда белок Fe1 d1 или фрагмент Fe1 d1 состоит из двух полипептидных цепей, такой белок Fe1 d1 или фрагмент Fe1 d1 имеет два N-конца и два С-конца. Линкер можно сливать как с двумя N-концами, так и с двумя С-концами. Предпочтительно линкер сливают только с одним из двух N-концов или только с одним из двух С-концов.

Связывание Fe1 d1, предлагаемого в изобретении, с ВПЧ с помощью гетеробифункционального перекрестносшивающего агента согласно описанным

выше предпочтительным методом позволяет осуществлять сочетание Fe1 d1, предлагаемого в изобретении, с ВПЧ в определенной ориентации. Другие методы связывания Fe1 d1, предлагаемого в изобретении, с ВПЧ, включают методы, при которых Fe1 d1, предлагаемый в изобретении, перекрестно сшивают с ВПЧ с использованием карбодиимида ЭДК (1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид) и NHS (N-гидроксисукцинимид). Fe1 d1, предлагаемый в изобретении, можно также сначала тиолировать с помощью реакции, например, с SATA, SATP или иминотиолоном. Fe1 d1, предлагаемый в изобретении, после удаления при необходимости защитной группы, затем можно сшивать с ВПЧ с помощью следующего метода. После отделения избытка тиолирующего реагента Fe1 d1, предлагаемый в изобретении, подвергают взаимодействию с ВПЧ, которую предварительно активируют с помощью гетеробифункционального перекрестносшивающего агента, который содержит реактивный остаток цистеина и поэтому несет по меньшей мере одну или несколько функциональных групп, обладающих реакционной способностью в отношении остатков цистеина, с которым тиолированный Fe1 d1, предлагаемый в изобретении, может вступать в указанное выше взаимодействие. Необязательно в реакционную смесь вносят небольшие количества восстановителя. Согласно другим методам Fe1 d1, предлагаемый в изобретении, присоединяют к ВПЧ с помощью гомобифункционального перекрестносшивающего агента, такого как глутаровый альдегид, DSG, BM[PEO]₄, BS₃, (фирма Pierce) или других известных гомобифункциональных перекрестносшивающих агентов, несущих функциональные группы, которые обладают реакционной способностью в отношении аминокрупп или карбоксильных групп ВПЧ.

В других вариантах осуществления настоящего изобретения композиция содержит или в другом варианте практически состоит из вирусоподобной частицы, связанной с Fe1 d1, предлагаемым в изобретении, посредством химических взаимодействий, где по меньшей мере одно из этих взаимодействий не представляет собой ковалентную связь. Например, связывание ВПЧ с Fe1 d1, предлагаемым в изобретении, можно осуществлять путем биотинилирования ВПЧ и экспрессии Fe1 d1, предлагаемого в изобретении, в виде белка, слитого со стрептавидином.

Одну или несколько молекул антигена, т.е. Fe1 d1, предлагаемого в изобретении, можно присоединять к одной субъединице ВПЧ, предпочтительно из оболочечных белков РНК содержащего фага, предпочтительно через находящиеся на поверхности (презентируемые) остатки лизина ВПЧ из оболочечных белков РНК содержащего фага, если они истерически являются доступными. Специфической особенностью ВПЧ РНК содержащего фага и, в частности, ВПЧ из оболочечного белка фага Q β , является способность к сочетанию с несколькими антигенами на единицу. Это позволяет получать набор с высокой антигенной плотностью.

В наиболее предпочтительных вариантах осуществления изобретения Fe1 d1, предлагаемый в изобретении, связывают через остаток цистеина, добавленный либо к N-концу, либо к C-концу Fe1 d1, предлагаемого в изобретении, или остаток цистеина, встречающийся в естественных условиях в Fe1 d1, предлагаемом в изобретении, с остатками лизина оболочечных белков ВПЧ РНК содержащего фага и, в частности, оболочечного белка Q β .

Как описано выше, четыре остатка лизина презентуются на поверхности ВПЧ из оболочечного белка Q β . Как правило и предпочтительно, эти остатки дериватизируют путем реакции с молекулой перекрестносшивающего агента. В

случае, когда не все презентированные остатки лизина можно сшивать с антигеном, остатки лизина, которые прореагировали с перекрестносшивающим агентом, после стадии дериватизации сохраняются в виде, в котором молекула перекрестносшивающего агента присоединена к ϵ -аминогруппе. Этот приводит к исчезновению одного или нескольких положительных зарядов, что может оказывать отрицательное воздействие на растворимость и стабильность ВПЧ. При создании изобретения установлено, что путем замены некоторых остатков лизина на остатки аргинина, как это описано для мутантов оболочечных белков Q β , можно препятствовать чрезмерному уменьшению положительных зарядов, поскольку остатки аргинина не вступают во взаимодействие с предпочтительными перекрестносшивающими агентами. Кроме того, замена остатков лизина на остатки аргинина может приводить к получению более правильных наборов антигенов, так как для реакции с антигеном доступно меньшее количество сайтов.

Так, презентированные остатки лизина заменяли остатками аргинина в следующих мутантах оболочечного белка Q β : Q β -240 (Lys13-Arg; SEQ ID NO:15), Q β -250 (Lys 2-Arg, Lys13-Arg; SEQ ID NO:17), Q β -259 (Lys 2-Arg, Lys16-Arg; SEQ ID NO:19) и Q β -251; (Lys16-Arg, SEQ ID NO:18). Другим вариантом осуществления изобретения является мутант оболочечного белка Q β с одним дополнительным остатком лизина, т.е. Q β -243 (Asn 10-Lys; SEQ ID NO:16), который можно применять для получения набора с более высокой антигенной плотностью.

В одном из предпочтительных вариантов осуществления изобретения ВПЧ, предлагаемую в изобретении, получают рекомбинантно в хозяине, и при этом ВПЧ практически свободна от РНК хозяина, предпочтительно от нуклеиновых кислот хозяина. В следующем предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения композиция содержит также по меньшей мере одну полианионную макромолекулу, связанную, предпочтительно включенную или упакованную в ВПЧ. В еще одном предпочтительном варианте осуществления изобретения полианионная макромолекула представляет собой полиглутаминовую кислоту и/или полиаспарагиновую кислоту.

Практически свободный от РНК (или ДНК) хозяина, предпочтительно нуклеиновых кислот хозяина: Понятие «практически свободный от РНК хозяина, предпочтительно нуклеиновых кислот хозяина» в контексте настоящего описания относится к количеству РНК хозяина, предпочтительно нуклеиновых кислот хозяина, входящему в состав ВПЧ, которое, как правило и предпочтительно, составляет менее 30 мкг, предпочтительно менее 20 мкг, более предпочтительно менее 10 мкг, еще более предпочтительно менее 8 мкг, еще более предпочтительно менее 6 мкг, еще более предпочтительно менее 4 мкг, наиболее предпочтительно менее 2 мкг на 1 мг ВПЧ. Понятие «хозяин» в вышеуказанном контексте относится к хозяину, в котором ВПЧ получают рекомбинантным путем. Общепринятые методы определения количества РНК, предпочтительно нуклеиновых кислот, известны специалисту в данной области. Обычный и предпочтительный метод определения количества РНК, предпочтительно нуклеиновых кислот, предлагаемый в настоящем изобретении, описан в примере 17 РСТ/ЕР2005/055009, поданной 5 октября 2005 г. этим же агентством. Идентичные, сходные или аналогичные условия, как правило и предпочтительно, используют для определения количества РНК, предпочтительно нуклеиновых кислот, в предлагаемых в изобретении композициях, которые содержат ВПЧ, отличные от ВПЧ Q β . Модификации условий, которые могут потребоваться, известны специалисту в данной области. Следует понимать, что численные значения

определенных количеств, как правило и предпочтительно, представляют собой значения с отклонением $\pm 10\%$, предпочтительно с отклонением $\pm 5\%$ от указанного численного значения.

5 Полианионная макромолекула: Понятие «полианионная макромолекула» в контексте настоящего описания относится к молекуле с относительно высокой молекулярной массой, которая содержит повторяющиеся отрицательно заряженные группы, структура которых практически состоит из множества повторов единиц, полученных, фактически или умозрительно, из молекул с относительно невысокой
10 молекулярной массой. Полианионная макромолекула должна иметь молекулярную массу по меньшей мере 2000 Да, более предпочтительно по меньшей мере 3000 Да и еще более предпочтительно по меньшей мере 5000 Да. Понятие «полианионная макромолекула» в контексте настоящего описания, как правило и предпочтительно, относится к молекуле, которая не может активировать Толл-подобные рецепторы.
15 Так, понятие «полианионная макромолекула», как правило и предпочтительно, не включает лиганды Толл-подобных рецепторов и еще более предпочтительно не включает иммуностимулирующие субстанции, такие как лиганды Толл-подобных рецепторов, иммуностимулирующие нуклеиновые кислоты и
20 липополисахариды (LPS). Более предпочтительно понятие «полианионная макромолекула» в контексте настоящего описания относится к молекуле, которая может индуцировать производство цитокинов. Еще более предпочтительно понятие «полианионная макромолекула» исключает иммуностимулирующие субстанции. Понятие «иммуностимулирующая субстанция» в контексте настоящего описания
25 относится к молекуле, которая обладает способностью индуцировать и/или усиливать специфический иммунный ответ против антигена, входящего в композицию, предлагаемую в настоящем изобретении.

РНК хозяина, предпочтительно нуклеиновые кислоты хозяина: Понятие «РНК
30 хозяина, предпочтительно нуклеиновые кислоты хозяина» или понятие «РНК хозяина, предпочтительно нуклеиновые кислоты хозяина, имеющие вторичную структуру» в контексте настоящего описания относится к РНК или предпочтительно нуклеиновым кислотам, которые исходно синтезируются в хозяине. Однако РНК, предпочтительно нуклеиновые кислоты, могут подвергаться химическим и/или
35 физическим изменениям в процессе снижения количества или элиминации РНК, предпочтительно нуклеиновых кислот, как правило и предпочтительно, с помощью способов, предлагаемых в изобретении, например размер РНК, предпочтительно нуклеиновых кислот, может быть укорочен или их вторичная структура может быть
40 изменена. Однако полученные таким образом РНК или нуклеиновые кислоты все еще рассматриваются как РНК хозяина или нуклеиновые кислоты хозяина.

Методы определения количества РНК и снижения количества РНК, входящей в ВПЧ, описаны в РСТ/EP2005/055009, поданной этим же агентством 5 октября 2005 г., указанная заявка полностью включена в настоящее описание в качестве ссылки.
45 Снижение количества или элиминация РНК хозяина, предпочтительно нуклеиновых кислот хозяина, минимизирует или снижает нежелательные Т-клеточные ответы, такие как воспалительный Т-клеточный ответ и цитотоксический Т-клеточный ответ, и другие нежелательные побочные действия, такие как лихорадка, сохраняя при этом
50 сильный гуморальный иммунный ответ, специфический в отношении Fe1 d1.

Одним из предпочтительных вариантов осуществления изобретения является способ получения композиций, предлагаемых в изобретении, и конъюгата ВПЧ РНК содержащего бактериофага - Fe1 d1, предлагаемого в изобретении, где ВПЧ

получают рекомбинантно в хозяине и где ВПЧ практически свободна от РНК хозяина, предпочтительно нуклеиновых кислот хозяина, заключающийся в том, что осуществляют следующие стадии: а) получают рекомбинантно в хозяине вирусоподобную частицу (ВПЧ), которая несет по меньшей мере один первый сайт присоединения, где ВПЧ содержит оболочечные белки, их варианты или фрагменты РНК содержащего бактериофага; (б) «разбирают» вирусоподобную частицу до оболочечных белков РНК содержащего бактериофага, их вариантов или фрагментов; (в) очищают оболочечные белки, их варианты или фрагменты; (г) осуществляют повторную сборку очищенных оболочечных белков РНК содержащего бактериофага, их вариантов или фрагментов с получением вирусоподобной частицы, где вирусоподобная частица практически свободна от РНК хозяина, предпочтительно нуклеиновых кислот хозяина; и (д) связывают по меньшей мере один антиген, предлагаемый в изобретении, который несет по меньшей мере один второй сайт присоединения, с ВПЧ, полученной на стадии (г). В предпочтительном варианте осуществления изобретения повторную сборку очищенных оболочечных белков, их вариантов или фрагментов осуществляют в присутствии по меньшей мере одной полианионной макромолекулы.

В одном из предпочтительных вариантов осуществления изобретения композиция, предлагаемая в изобретении, содержит также по меньшей мере одну иммуностимулирующую субстанцию, которая обладает способностью индуцировать и/или повышать иммунный ответ. Предпочтительно иммуностимулирующая субстанция представляет собой лиганд Толл-подобного рецептора, предпочтительно выбранный из группы, включающей: (а) иммуностимулирующие нуклеиновые кислоты; (б) пептидогликаны; (в) липополисахариды; (г) липотеиховые кислоты; (д) имидазохинолиновые производные; (е) флагеллины; (ж) липопротеины; (з) иммуностимулирующие органические молекулы; (и) неметилованные содержащие CpG олигонуклеотиды; и (к) любые смеси субстанций, перечисленных в (а), (б), (в), (г), (д), (е), (ж), (з) и (и).

В еще одном предпочтительном варианте осуществления изобретения иммуностимулирующую нуклеиновую кислоту предпочтительно выбирают из группы, включающей: (а) нуклеиновую кислоту бактериального происхождения; (б) нуклеиновую кислоту вирусного происхождения; (в) нуклеиновую кислоту, содержащую неметилованный мотив CpG; (г) двухцепочечную РНК; (д) одноцепочечную РНК и (ж) нуклеиновую кислоту, не содержащую неметилованный мотив CpG. Иммуностимулирующие нуклеиновые кислоты, которые не содержат неметилованный мотив CpG, известны из существующего уровня техники, например, описаны в WO 01/22972. Понятие «нуклеиновая кислота» в контексте настоящего описания относится к молекуле, состоящей из линейно ковалентно связанных мономеров (нуклеотидов). Оно относится к молекулярной цепи нуклеотидов и не касается конкретной длины продукта. Так, олигонуклеотиды подпадают под понятие «нуклеиновая кислота». Связь между нуклеотидами, как правило и предпочтительно, представляет собой фосфодиэфирную связь. Под объемом настоящего изобретения подпадают также нуклеиновые кислоты, содержащие модификации связей, например фосфотиоатную связь.

В одном из предпочтительных вариантов осуществления изобретения иммуностимулирующую субстанцию смешивают с рекомбинантной ВПЧ. В другом предпочтительном варианте осуществления изобретения иммуностимулирующую субстанцию связывают, предпочтительно упаковывают внутрь ВПЧ, предлагаемой в

изобретении.

5 Подробные описания иммуностимулирующей субстанции, прежде всего иммуностимулирующей нуклеиновой кислоты, более конкретно олигонуклеотидов, содержащих неметилованный CpG, представлены в WO 03/024480, 03/024481 и
10 РСТ/ЕР/04/003165. Методы смешения иммуностимулирующих субстанций с комплексом ВПЧ-антиген, описаны в WO 03/024480. Методы упаковки иммуностимулирующих субстанций внутрь ВПЧ описаны в WO 03/024481. Полное содержание заявок WO 03/024480, 03/024481 и РСТ/ЕР/04/003165 включено в
15 настоящее описание в качестве ссылки. ВПЧ может, как правило, индуцировать и/или усиливать иммунную систему. Однако понятие «иммуностимулирующая субстанция» в контексте настоящего описания относится к иммуностимулирующей субстанции, которая не представляет собой ВПЧ, которую применяют в композициях, предлагаемых в изобретении, а относится к субстанции, добавляемой к ВПЧ.

20 Введение иммуностимулирующих субстанций, предпочтительно иммуностимулирующих нуклеиновых кислот, в композицию, предлагаемую в изобретении, может сдвигать иммунные ответы в сторону Th1-ответов и тем самым подавлять Th2-ответы.

25 Одним из объектов изобретения является вакцина, которая содержит композицию, предлагаемую в изобретении. Другим объектом изобретения является вакцина, которая содержит композицию, предлагаемую в изобретении, и приемлемый буфер. В одном из предпочтительных вариантов осуществления изобретения в состав
30 вакцины входит также по меньшей мере один адъювант. Введение по меньшей мере одного адъюванта можно осуществлять до, одновременно или после введения композиции, предлагаемой в изобретении. Понятие «адъювант» в контексте настоящего описания относится к неспецифическим стимуляторам иммунного ответа или субстанциям, которые обеспечивают образование депо в хозяине, и при
35 объединении с вакциной и фармацевтической композицией соответственно, предлагаемыми в настоящем изобретении, могут еще в большей степени усиливать иммунный ответ.

40 В другом предпочтительном варианте осуществления изобретения в состав вакцины не входит адъювант. Важной особенностью настоящего изобретения является высокая иммуногенность композиции, даже в отсутствии адъювантов. Отсутствие адъювантов может снижать возможность возникновения побочных действий, связанных с применением адъювантов. Таким образом, введение вакцины,
45 предлагаемой в изобретении, пациенту предпочтительно осуществляют без введения по меньшей мере одного адъюванта этому пациенту до, одновременно или после введения вакцины.

50 В изобретении предложен также способ иммунизации, заключающийся в том, что человеку или млекопитающему кроме человека, такому как собака или кошка, вводят вакцину, предлагаемую в настоящем изобретении. Не ограничивая объем
55 настоящего изобретения какой-либо теорией, инъекция композиции вакцины, предлагаемой в изобретении, кошке может нейтрализовать Fe1 d1 и снизить тем самым количество Fe1 d1 в кошачьей слюне.

60 Вакцину можно вводить различными хорошо известными в данной области путями, но, как правило, ее вводят путем инъекции, инфузии, ингаляции, орально или с использованием других пригодных физических методов. Альтернативно этому конъюгаты можно вводить внутримышечно, внутривенно, через слизистую,

чрескожно, интраназально, внутривенно или подкожно. Компонентами конъюгатов, предназначенных для введения, являются стерильные водные (например, физиологические растворы) или неводные растворы и суспензии.

Примерами неводных растворителей являются пропиленгликоль, полиэтиленгликоль, растительные масла, такие как оливковое масло, и пригодные для инъекции органические сложные эфиры, такие как этилолеат. Для повышения способности проникать через кожу и повышения абсорбции антигена можно применять носители или окклюзионные повязки.

Считается, что вакцины, предлагаемые в изобретении, являются «фармакологически приемлемыми», если при их введении они переносятся конкретным реципиентом. Кроме того, вакцины, предлагаемые в изобретении, следует вводить в «терапевтически эффективном количестве» (т.е. в количестве, которое вызывает требуемое терапевтическое действие). Природа или тип иммунного ответа не имеет решающего значения в контексте настоящего описания. Не ограничивая объем настоящего изобретения следующим механистическим объяснением, можно считать, что вакцина, предлагаемая в изобретении, может индуцировать антитела, преимущественно IgG-подтипов, которые связываются с Fe1 d1, и тем самым предупреждают распознавание Fe1 d1 в результате связывания IgE с тучными клетками и базофилами. Альтернативно или одновременно композиция, предлагаемая в настоящем изобретении, сдвигает иммунные ответы в сторону Th1-ответов, подавляя развитие Th2-ответов, и, как следствие, производство антител типа IgE, которые являются основным компонентом аллергических реакций.

Одним из объектов изобретения является фармацевтическая композиция, содержащая композицию, предлагаемую в настоящем изобретении, и приемлемый фармацевтический носитель. Когда вакцину, предлагаемую в изобретении, вводят индивидууму, она может находиться в форме, которая содержит соли, буферы, адъюванты или другие субстанции, которые требуются для повышения эффективности конъюгата. Примеры материалов, которые можно применять для приготовления фармацевтических композиций, даны в многочисленных справочниках, включая remington's pharmaceutical sciences (под ред. Osol A, изд-во Mack Publishing Co., 1990).

Изобретение относится к получению композиции, предлагаемой в изобретении, заключающемуся в том, что осуществляют следующие стадии: (а) получают коровую частицу, которая несет по меньшей мере один первый сайт присоединения, где коровая частица представляет собой вирусоподобную частицу или вирусную частицу; (б) получают по меньшей мере один антиген, который несет по меньшей мере один второй сайт присоединения, где по меньшей мере антиген представляет собой белок Fe1 d1 или фрагмент Fe1 d1, и (в) объединяют коровую частицу и по меньшей мере один антиген с получением композиции, где по меньшей мере один антиген и коровая частица связаны через первый и второй сайты присоединения.

В другом варианте осуществления изобретения стадия получения коровой частицы, которая несет по меньшей мере один первый сайт присоединения, предусматривает, что осуществляют следующие дополнительные стадии: (а) «разбирают на части» коровую частицу до оболочечных белков, их мутантов или фрагментов; (б) очищают оболочечные белки, их мутанты или фрагменты; (в) осуществляют повторную сборку очищенных оболочечных белков, их мутантов или фрагментов коровой частицы, где коровая частица практически свободна от РНК хозяина, предпочтительно нуклеиновых кислот хозяина. В еще одном

предпочтительном варианте осуществления изобретения повторную сборку очищенных коровьих белков осуществляют в присутствии по меньшей мере одной полианионной макромолекулы или по меньшей мере одной иммуностимулирующей нуклеиновой кислоты.

Одним из объектов изобретения является способ применения композиций, предлагаемых в изобретении, для предупреждения и/или лечения аллергии на кошек у млекопитающего, где предпочтительно млекопитающее представляет собой человека или собаку.

Еще одним объектом изобретения является применение композиции, предлагаемой в изобретении, в качестве лекарственного средства. Другим объектом изобретения является применение композиции, предлагаемой в изобретении, для приготовления лекарственного средства, предназначенного для лечения аллергии на кошек у млекопитающего, где предпочтительно млекопитающее представляет собой человека или собаку.

Следующим объектом изобретения является слитый белок Fe1 d1, который содержит цепь 1 Fe1 d1 и цепь 2 Fe1 d1, слитые через аминокислотный спейсер, который связывает N-конец одной цепи с С-концом другой цепи, где аминокислотный спейсер состоит из аминокислотной последовательности длиной 10-30, предпочтительно 10-25, предпочтительно 10-20, предпочтительно 13-20, предпочтительно 15-20, предпочтительно 13-17, предпочтительно 15-17 аминокислотных остатков, и где слитый белок не представляет собой слитый белок, который содержит цепь 1, имеющую последовательность SEQ ID NO:22, слитую через (GGGGS)₃ с N-концом цепи 2, которая имеет последовательность SEQ ID NO:23, 25 или 26, и где этот слитый белок, не подпадающий под объем формулы изобретения, экспрессируют в бакуловирусной системе экспрессии.

В WO 2004/094639 описан слитый белок Fe1 d1, полученный в результате связывания цепи 1 и цепи 2 с помощью линкера, выбранного из связи типа углерод-азот и короткого пептида, т.е. имеющего от 1 до 9, предпочтительно от 1 до 5, особенно предпочтительно от 1 до 3 аминокислот. При создании изобретения также неожиданно установлено, что связь или короткий пептид не индуцирует заметное конформационное ограничение или отсутствие складчатости. Однако в WO 2004/094639 не описан линкер, состоящий более чем из 9 аминокислот.

В WO 00/20032 описан экспрессируемый в бакуловирусе рекомбинантный Fe1 d1, который содержит цепь 1 и цепь 2, экспрессируемые в виде серий и связанные друг с другом глицин/сериновым линкером (GGGGS)₃. В WO 00/20032 описано также, что иммунореактивность rFe1 d1 в отношении антител типа IgG и IgE резко повышается при экспрессии аллергена в бакуловирусе по сравнению с экспрессией аллергена в E.coli.

Слитый белок Fe1 d1, предлагаемый в изобретении, можно получать либо в прокариотической системе экспрессии, либо в эукариотической системе экспрессии, такой как бакуловир. В одном из предпочтительных вариантов осуществления изобретения слитый белок Fe1 d1, предлагаемый в изобретении, получают в E.coli.

В одном из предпочтительных вариантов осуществления изобретения спейсер, входящий в слитый белок Fe1 d1, предлагаемый в изобретении, состоит из аминокислотной последовательности, которая несет 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 аминокислотных остатков.

В одном из предпочтительных вариантов осуществления изобретения спейсер, входящий в слитый белок Fe1 d1, состоит из аминокислотной последовательности,

несущей 2, 3 или 4 повтора GGGGS.

В одном из предпочтительных вариантов осуществления изобретения цепь 2 Fe1 d1 представляет собой N-концевой слитый белок, предлагаемый в изобретении.

В другом предпочтительном варианте осуществления изобретения цепь 1 Fe1 d1
5 представляет собой N-концевой слитый белок, предлагаемый в изобретении. В одном из предпочтительных вариантов осуществления изобретения слитый белок, предлагаемый в изобретении, получают в E.coli. В одном из наиболее предпочтительных вариантов осуществления изобретения слитый белок Fe1 d1,
10 предлагаемый в изобретении, содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, включающей: (а) SEQ ID NO:54; (б) SEQ ID NO:55; и (в) SEQ ID NO:57. Изобретение относится также к нуклеотидной последовательности, которая кодирует слитый белок Fe1 d1, предлагаемый в изобретении. В одном из
15 предпочтительных вариантов осуществления изобретения нуклеотидную последовательность, которая кодирует слитый белок, предлагаемый в изобретении, выбирают из группы, включающей: (а) SEQ ID NO:54; (б) SEQ ID NO:55; и (в) SEQ ID NO:57. В одном из предпочтительных вариантов осуществления изобретения слитый белок Fe1 d1, предлагаемый в изобретении, получают в E.coli. В другом
20 предпочтительном варианте осуществления изобретения слитый белок Fe1 d1, предлагаемый в изобретении, содержит или в другом варианте состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO:57, где слитый белок, предлагаемый в изобретении, получают в E.coli.

Одним из объектов изобретения является применения слитого белка Fe1 d1,
25 предлагаемого в изобретении, для диагностики и лечения аллергии на кошек.

Примеры

Пример 1

Получение ВПЧ Q β , предлагаемых в изобретении, путем разборки на
30 части/повторной сборки в присутствии различных полианионных макромолекул, что приводит к повторной сборке ВПЧ Q β

(А) Разборка на части известных из прототипов ВПЧ Q β

45 мг известных из прототипов ВПЧ Q β (2,5 мг/мл, как установлено методом Брэдфорда) в 3ФР (20 мМ фосфат, 150 мМ NaCl, pH 7,5), очищенных из лизата E.coli,
35 восстанавливали с использованием 10 мМ ДТТ в течение 15 мин при комнатной температуре в условиях перемешивания. Затем добавляли хлорид магния до конечной концентрации 0,7М и инкубирование продолжали в течение 15 мин при комнатной температуре в условиях перемешивания, что приводило к осаждению инкапсулированной РНК клеток-хозяев. Раствор центрифугировали в течение 10 мин
40 при 4000 об/мин при 4°C (центрифугу Эппендорфа 5810 R с фиксированным углом ротора А-4-62 использовали на всех последующих стадиях) для удаления осажденной РНК из раствора. Супернатант, содержащий высвободившийся димерный оболочечный белок Q β , применяли для хромато графической очистки.

45 (Б) Очистка оболочечного белка Q β с помощью катионообменной хроматографии и гель-фильтрации

Супернатант, полученный в результате реакции разборки на части, который содержит димерный оболочечный белок, белки клетки-хозяина и оставшуюся РНК
50 клетки-хозяина, разбавляли в соотношении 1:15 водой, доводя проводимость до уровня ниже 10 мС/см, и вносили на SP-сефарозную FF-колонку (хк16/20, 6 мл, фирма Amersham Bioscience). Предварительно колонку уравнивали 20 мМ натрий-фосфатным буфером, pH 7. Элюирование связанного оболочечного белка

осуществляли с помощью ступенчатого градиента до 20 мМ фосфата натрия/500 мМ хлорида натрия и белок собирали, получая фракцию, объемом примерно 25 мл. Хроматографию осуществляли при комнатной температуре со скоростью потока 5 мл/мин и абсорбцию оценивали при 260 нм и 280 нм.

На второй стадии выделенный оболочечный белок Q β (фракция, элюированная из катионообменной колонки) вносили (два погона) на сефакриловую S-100 HR-колонку (хк26/60, 320 мл, фирма Amersham Bioscience), уравновешенную 20 мМ фосфатом натрия/250 мМ хлоридом натрия; pH 6,5. Хроматографию осуществляли при комнатной температуре при скорости потока 2,5 мл/мин и абсорбцию оценивали при 260 нм и 280 нм. Собирали фракции объемом 5 мл.

(B1) Повторная сборка ВПЧ Q β путем диализа

Очищенный оболочечный белок Q β (2,2 мг/мл в 20 мМ натрий-фосфатном буфере, pH 6,5), одну полианионную макромолекулу (2 мг/мл в воде), мочевины (7,2М в воде) и ДТТ (0,5М в воде) смешивали до конечных концентраций 1,4 мг/мл оболочечного белка, 0,14 мг/мл соответствующей полианионной макромолекулы, 1М мочевины и 2,5 мМ ДТТ. Смеси (по 1 мл каждой) подвергали диализу в течение 2 дней при 5°C в 20 мМ Трис $\times$ HCl, 150 мМ NaCl, pH 8, используя мембрану, отсекающую молекулярную массу 3,5 кДа. Полианионные макромолекулы представляли собой: полигалактуроновую кислоту (25000-50000, фирма Fluka), сульфат декстрана (ММ 5000 и 10000, фирма Sigma), поли-L-аспарагиновую кислоту (ММ 11000 и 33400, фирма Sigma), поли-L-глутаминовую кислоту (ММ 3000, 13600 и 84600, фирма Sigma) и тРНК из пекарских дрожжей и зародыша пшеницы.

(B2) Повторная сборка ВПЧ Q β путем диафильтрации (сочетание диализа с фильтрацией)

33 мл очищенного оболочечного белка Q β (1,5 мг/мл в 2 мМ натрий-фосфатной буфере, pH 6,5, 250 мМ NaCl) смешивали с водой и мочевиной (7,2М в воде), NaCl (5М в воде) и поли-L-глутаминовой кислотой (2 мг/мл в воде, ММ: 84600). Объем смеси составлял 50 мл, а конечные концентрации компонентов были следующие: 1 мг/мл оболочечного белка, 300 мМ NaCl, 1,0М мочевины и 0,2 мг/мл поли-L-глутаминовой кислоты. Затем смесь подвергали диафильтрации при комнатной температуре в противотоке 500 мл 20 мМ Трис $\times$ HCl, pH 8, 50 мМ NaCl, применяя скорость поперечного потока 10 мл/мин и скорость проникающего потока 2,5 мл/мин, в устройстве для фильтрации с тангенциальным потоком с использованием мембранного картриджа Pellicon XL (Biomax 5K, фирма Millipore).

Пример 2

Сборка in vitro ВПЧ AP205

(А) Очистка оболочечного белка AP205

Разборка на части: 20 мл раствора ВПЧ AP205 (1,6 мг/мл в 3ФР, очищенных из экстракта E.coli) смешивали с 0,2 мл 0,5М ДТТ и инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре. Добавляли 5 мл 5М NaCl и затем смесь инкубировали в течение 15 мин при 60°C, что приводило к осаждению восстановленных с помощью ДТТ оболочечных белков. Мутную смесь центрифугировали (ротатор Sorvall SS34, 10000 $\times$ g, 10 мин, 20°C) и супернатант отбрасывали, а дебрис диспергировали в 20 мл смеси 1М мочевины/20 мМ Na-цитрат, pH 3,2. После перемешивания в течение 30 мин при комнатной температуре значение pH дисперсии доводили до 6,5, добавляя 1,5М Na₂HPO₄, а затем центрифугировали (ротатор Sorvall SS34, 10000 $\times$ g, 10 мин, 20°C) для получения супернатанта, содержащего димерный оболочечный белок.

Катионообменная хроматография; Супернатант (см. выше) разбавляли 20 мл

воды, доводя проводимость примерно до 5 мС/см. Образовавшийся раствор вносили на колонку, заполненную 6 мл SP сефарозы FF (фирма Amersham Bioscience), которую предварительно уравнивали 20 мМ натрий-фосфатным буфером, рН 6,5. После внесения образцов колонку промывали 48 мл 20 мМ натрий-фосфатного буфера, рН 6,5, а затем элюировали связанный оболочечный белок с помощью линейного градиента до 1М NaCl, взятого в объеме, равном 20 объемам колонки. Фракции основного пика объединяли и анализировали с помощью ДСН-ПААГ и анализировали УФ-спектроскопией. Согласно данным ДСН-ПААГ выделенный оболочечный белок был практически очищенным от других белковых загрязнителей. Согласно данным УФ-спектроскопии концентрация белка составляла 0,6 мг/мл (общее количество 12 мг), принимая, что 1 единице A280 соответствует 1,01 мг/мл оболочечного белка AP205. Кроме того, соотношение уровня A280 (0,5999) и уровня A260 (0,291) составляет примерно 2, это свидетельствует о том, что препарат практически свободен от нуклеиновых кислот.

(Б) Сборка ВПЧ AP205

Сборка без какой-либо полианионной макромолекулы: Указанную выше элюированную белковую фракцию подвергали диафильтрации и концентрировали с помощью TFF до достижения концентрации белка 1 мг/мл в 20 мМ натрий-фосфатном буфере, рН 6,5. 500 мкл этого раствора смешивали с 50 мкл 5М раствора NaCl и инкубировали в течение 48 ч при комнатной температуре. Образование повторно собранных ВПЧ в смеси подтверждали с помощью невосстанавливающего ДСН-ПААГ и ЖХВР-гель-фильтрации. Для ЖХВР-анализа применяли колонку TSKgel G5000 PWWL (фирмы Tosoh Bioscience), уравниваемую 20 мМ фосфатом натрия, 150 мМ NaCl рН 7,2.

Сборка в присутствии полиглутаминовой кислоты; 375 мкл очищенного оболочечного белка AP205 (1 мг/мл в 20 мМ натрий-фосфатном буфере, рН 6,5) смешивали с 50 мкл маточного раствора NaCl (5М в воде), 50 мкл маточного раствора полиглутаминовой кислоты (2 мг/мл в воде, ММ: 86400, фирма Sigma) и 25 мкл воды. Смесь инкубировали в течение 48 ч при комнатной температуре. Образование повторно собранных ВПЧ в смеси подтверждали с помощью невосстанавливающего ДСН-ПААГ и ЖХВР-гель-фильтрации. Оболочечный белок, присутствующий в смеси, практически полностью был включен в ВПЧ, что свидетельствует о более высокой эффективности сборки по сравнению со сборкой оболочечного белка AP205 без какой-либо полианионной макромолекулы.

Пример 3

Клонирование слитых белков Fe1 d1

Гены, кодирующие цепь 1 и цепь 2 Fe1 d1 соответственно, получали путем ПЦР-амплификации с использованием перекрывающихся ПЦР-праймеров согласно описанному ниже методу. «Прямой» (F) и «обратный» (R) праймеры представлены ниже. Фрагменты встраивали путем лигирования в вектор pCRII-TOPO (фирма Invitrogen) и трансформировали им штамм XL1-Blue.

Подтверждали последовательность вставок цепи 1 и цепи 2 Fe1 d1.

Последовательность праймера 1F: SEQ ID NO:34;

последовательность праймера 2R: SEQ ID NO:35;

последовательность праймера 3F: SEQ ID NO:36;

последовательность праймера 4R: SEQ ID NO:37;

последовательность праймера 5F: SEQ ID NO:38;

последовательность праймера 6R: SEQ ID NO:39;

последовательность праймера 7F: SEQ ID NO:40;
 последовательность праймера 8R: SEQ ID NO:41;
 последовательность праймера 9F: SEQ ID NO:42;
 последовательность праймера 10R: SEQ ID NO:43.

5 Слитые конструкции Fe1 d1:

Обозначение «FELD1» относится к белку, цепь 2 которого на N-конце слита непосредственно с цепью 1. Нуклеотидные последовательности, кодирующие FELD1, создавали путем ПЦР с удлинением посредством сплайсингового

10 перекрытия (SOE) с использованием праймерного линкера 11 (SEQ ID NO:44).

Обозначение «FD12» относится к белку, цепь 1 которого на N-конце непосредственно слита с цепью 2. Нуклеотидную последовательность, кодирующую FD12, создавали путем ПЦР с удлинением посредством сплайсингового перекрытия (SOE) с использованием праймеров 12-1 (SEQ ID NO:45),
 15 12-3 (SEQ ID NO:46) и 12-2-1 (SEQ ID NO:47).

Обозначения «FELD1-10aa» и «FELD1-15aa» относятся к белкам, цепь 2 которых на N-концах слита через состоящий из 10 (GGGGS)₂ или 15 аминокислот (GGGGS)₃ аминокислотный спейсер соответственно с цепью 1 на C-конце. Плазмиду, содержащую нуклеотидную последовательность, которая кодирует FELD1,
 20 применяли в качестве матрицы для создания состоящего из 10 аминокислот или 15 аминокислот спейсера путем мутагенеза на основе обратной ПЦР (ОПЦРМ). Для спейсера 1-15 использовал два праймера (праймер 1-10aa, SEQ ID NO:48 и праймер 2-5aa, SEQ ID NO:49). Для спейсера 1-10 использовали два праймера (праймер 1-5aa,
 25 SEQ ID NO:50 и праймер 2-5aa). Образовавшийся ПЦР-фрагмент замыкали путем лигирования. Он обладает устойчивостью к расщеплению Dpn I, которая представляет собой единственную рестриктазу, распознающую последовательность, которая содержит метилированный аденин, в то время как плазмидная матрица
 30 расщепляется Dpn I.

Обозначения «FD12-10aa» и «FD12-15aa» относятся к белкам, цепь 1 которых на N-конце слита через состоящий из 10 (GGGGS)₂ или 15 аминокислот (GGGGS)₃ аминокислотный спейсер соответственно с цепью 2 на C-конце. Слияние FD12-10aa и FD12-15aa осуществляли аналогично описанному выше методу. Для состоящего
 35 из 15 аминокислот спейсера использовали праймер FD2-10aa (SEQ ID NO:51) и праймер FD1-5aa (SEQ ID NO:52). Для состоящего из 10 аминокислот спейсера использовали праймеры FD1-5aa и FD2-5aa (SEQ ID NO:53).

Пример 4

40 Экспрессия в бактериях и очистка меченных с помощью His слитых белков Fe1 d1

Нуклеотидные последовательности, которые кодируют различные слитые конструкции Fe1 d1, описанные в примере 3, субклонировали в основанной на T7 экспрессионной системе pET-42T(+), которая является модификацией плазмиды pET-42a(+) (фирма Novagen). С-конец слитых конструкций сливали с
 45 последовательностью His-метки, за которой был расположен GGC, т.е. аминокислотный линкер, содержащий цистеин в качестве второго сайта присоединения. Образовавшиеся конструкции обозначали, добавляя на конце «-НС».

FELD1-НС, FELD1-10aa-НС и FELD1-15aa-НС и FD12-15aa-НС экспрессировали и
 50 очищали следующим образом: Плазмидой трансформировали штамм BL21(DE3). Экспрессию индуцировали, добавляя к культуре 1 мМ ИПТГ (изопропилтиогалактозид) при ОП₆₀₀, составляющей примерно 1. Культуру выращивали в течение еще 20 ч при 20°C, собирали и лизировали обработкой

ультразвуком в нативном буфере для лизиса (50 мМ NaH_2PO_4 , 300 мМ NaCl , 10 мМ имидазол, pH 8,0). Объем осветленного бактериального лизата доводили до 50 мл нативным буфером для лизиса. Добавляли 5 мл содержащей никель-нитрилоуксусную кислоту (Ni-NTA) агарозу (фирма Qiagen) и лизат инкубировали

5 путем переворачивания в течение 1 ч при 4°C. Неспецифические связанные белки удаляли путем 4-кратной отмывки буфером для лизиса. Связанный белок элюировали путем ресуспендирования Ni-NTA-агарозой и 2 мл буфера для элюции (50 мМ NaH_2PO_4 , 300 мМ NaCl , 250 мМ имидазол, pH 8,0).

10 Пример 5

Окислительная укладка дисульфидных мостиков в очищенных слитых белках Fe1 d1

Очищенный с помощью Ni^{2+} -аффинной хроматографии FELD1-НС состоит из различных видов с молекулярной массой от 15 до 20 кДа. Для нативной

15 укладки FELD1-НС использовали внутримолекулярную повторную перестановку (решуффлинг) дисульфидных связей окисленным глутатионом (GSSG, фирма Applichem) и восстановленным глутатионом (GSH, фирма Applichem) при молярном соотношении 1:1. Реакцию осуществляли в течение 24 ч сразу после

20 элюции FELD1 в буфере для элюции путем добавления 2,5 мМ GSSG и 2,5 мМ GSH при комнатной температуре. После повторной укладки FELD1-НС характеризуется одной полосой, соответствующей молекулярной массе 15 кДа в

невосстанавливающих условиях (фиг.1, первая панель, полоса 2). Потенциально свободные сульфгидрильные группы FELD1-НС алкилировали йодацетамидом

25 (фирма Sigma). Зонды обрабатывали 5 мМ йодацетамидом в 20 мМ бикарбонате аммония при pH 8,0 в течение 15 мин при комнатной температуре.

Повторно уложенный FELD1-НС дополнительно очищали до гомогенного состояния с помощью гель-фильтрации (SEC) (Superdex 75 пг, фирма Amersham

30 Pharmacia Biosciences) при уравнивании в 3ФР.

FELD1-10aa-НС и FELD1-15aa-НС ренатурировали практически аналогично описанному выше методу (фиг.1, две средние панели).

Для нативной укладки FD12-15aa-НС также использовали повторную

35 перестановку (решуффлинг) дисульфидных связей окисленным глутатионом и восстановленным глутатионом при молярном соотношении 1:1. После элюции FD12-15aa разводили двадцатикратно в буфере для повторной укладки FD12-15aa (50 мМ Tris-Cl pH 8,5, 240 мМ NaCl , 10 мМ KCl , 1 мМ ЭДТК, 0,05% ПЭГ-3550, 1 мМ GSH, 0,1 мМ GSSH) и инкубировали при 4°C в течение 24 ч. После повторной

40 укладки FD12-15aa характеризуется одной полосой, соответствующей молекулярной массе 20 кДа, по сравнению с восстановленной формой, которой соответствует молекулярная масса 23 кДа (фиг.1, последняя панель).

Пример 6

Слитые белки Fe1 d1 распознаются эпитопспецифическими моноклональными

45 антителами

Связывание слитых белков Fe1 d1 в сравнении с встречающимся в естественных условиях Fe1 d1 (nFe1 d1) с эпитопспецифическими моноклональными антителами (МАт) оценивали с помощью сэндвич-ELISA, используя набор Fe1 d1 ELISA (6F9/3E4)

50 от фирмы Indoor biotechnologies (Кардифф, Великобритания).

В целом, метод состоял в следующем: МАт к Fe1 d1 6F9, поставляемое в виде маточного раствора с концентрацией 2 мг/мл, разводили в соотношении 1:1000 в 50 мМ карбонат-бикарбонатном буфере, pH 9,6. Титрационные микропланшеты

сенсibilизировали 100 мкл разведенного МАт 6F9 на лунку при 4°C в течение ночи. Планшеты отмывали трижды 3ФР-0,05% Твин-20 (3ФР-Т) и затем блокировали 100 мкл блокирующего буфера (1% БСА (фирма Sigma) в 3ФР-Т). Затем титрационные микропланшеты инкубировали в течение 1 ч с 100 мкл слитых белков Fe1 d1 или стандарта nFe1 d1 (фирма Indoors technologies; Великобритания), используя с дублированием разведения от 80 до 0,16 нг/мл. Стандартный (референс) образец nFe1 d1 создавали в качестве подстандarta из СВЕР-стандarta из перхоти кошек E10, который содержал 13,47 ед./мл Fe1 d1 (1 единица = 4 мг белка).

Затем планшеты отмывали и добавляли по 100 мкл разведенного (1:1000 в 1% БСА/3ФР-Т) биотинилированного МАт к Fe1 d1 3Е4 и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. Планшеты отмывали трижды 3ФР-Т, используя по 100 мкл разведенного конъюгата (1:1000 в 1% БСА/3ФР-Т) стрептавидин-пероксидаза (фирма Sigma, S5512, 0,25 мкг восстановленного в 1 мл дистиллированной воды). После инкубации в течение 30 мин при комнатной температуре лунки отмывали трижды 3ФР-Т. Обнаружение осуществляли с помощью раствора субстрата OPD и 5%-ной H₂SO₄ в качестве стоп-раствора. Абсорбцию оценивали с помощью ELISA-ридера (фирма BioRad) при 450 нм и для расчета среднеарифметических значений и стандартного отклонения среднего значения (СКО) использовали программу EXCEL (MS Office; фирма Microsoft). Результаты представлены в таблице 1. Таким образом, распознавание слитых белков Fe1 d1 и nFe1 d1 эпитопспецифическими МАт отражает высокое сходство антигенности обоих белков.

Таблица 1				
Исучаемые белки	FELD1-NC	FELD1-10aa-NC	FELD1-15aa-NC	Встречающийся в естественных условиях Fe1 d1
Fe1 d1 (нг/мл) при ОП _{50%}	8,4	6,7	7,9	7,2

Пример 7

Сочетание слитых белков Fe1 d1 с ВПЧ из Qβ

Раствор, содержащий 143 мкМ ВПЧ Qβ в HEPES-буфере (20 мМ HEPES, 150 мМ NaCl, pH 7,2), подвергали взаимодействию с 5-кратным молярным избытком (715 мкМ) SMPH (фирма Pierce) в течение 30 мин при 25°C при встряхивании. SMPH получали из 50 мМ маточного раствора в диметилсульфоксиде. Продукты реакции подвергали диализу в противотоке 3ФР с двумя замена в устройстве для диализа с отсечением молекулярной массы 10000 Да (Slide-A-Lyzer, фирма Pierce). Диализ осуществляли при температуре от 4°C до комнатной температуры с использованием более чем 1000-кратного избытка буфера по отношению к реакционной смеси.

Перед сочетанием слитых белков Fe1 d1 с дериватизированной SMPH ВПЧ Qβ инкубировали FELD1, FELD1-10aa, FELD1-15aa и FD12-15aa соответственно, полученные согласно методу, описанному в примере 5, с TCER (трихлорэтилфосфат) (фирма Pierce, Perbio Science) в эквимольных количествах в течение 30 мин при комнатной температуре.

Добавляли слитые белки Fe1 d1 в 5-кратном молярном избытке к 143 мкМ раствору дериватизированных с помощью SMPH ВПЧ Qβ. Реакционный объем составлял 650 мкл и параллельно осуществляли несколько реакций. Реакционные смеси инкубировали в течение 4 ч при комнатной температуре при встряхивании. После сочетания аликвоты центрифугировали при 16000×g в течение 3 мин при 4° до получения дебриса нерастворенного материала. Супернатанты объединяли в чистые пробирки. Сочетание слитых белков Fe1 d1 с ВПЧ Qβ оценивали с помощью ДСН-

ПААГ в восстанавливающих условиях.

Практически аналогично осуществляли сочетание слитых белков Fe1 d1 с повторно собранной ВПЧ Q β (полученной согласно методу, описанному в примере 1).

Пример 8

Сочетание FELD1, FELD1-15aa и FD12-15aa с HBcAg1-185-Lys

Конструирование HBcAg1-185-Lys, его экспрессия и очистка описаны в целом в примерах 2-5 WO 03/040164. Раствор, содержащий 120 мМ ВПЧ HBcAg1-185-Lys в 20 мМ Hepes, 150 мМ NaCl, pH 7,2, подвергали взаимодействию в течение 30 мин при 25°C на качающемся шейкере с 25-кратным молярным избытком SMPH (фирма Pierce), который получали разведением маточного раствора в ДМСО. Затем реакционный раствор подвергали диализу дважды в течение 2 ч в противотоке 1 л 20 мМ Hepes, 150 мМ NaCl, pH 7,2 при 4°C. Затем полученную после диализа реакционную смесь HBcAg1-185-Lys подвергали взаимодействию с рекомбинантным Fe1 d1, полученным согласно методу, описанному в примере 5. Для реакции сочетания FELD1, FELD1-15aa и FD12-15aa соответственно использовали их двукратный молярный избыток относительно дериватизированной ВПЧ HBcAg1-185-Lys. Реакцию сочетания осуществляли в течение 4 ч при 25°C на качающемся шейкере.

Пример 9

Сочетание FELD1, FELD1-15aa и FD12-15aa с ВПЧ, полученными из AP205

Получение ВПЧ AP205 описано в примерах 1 и 2 WO 2004/007538. Дериватизацию ВПЧ AP205 осуществляли практически аналогично методу получения ВПЧ Q β , описанному в примере 7. Перед сочетанием слитых белков Fe1 d1 с дериватизированной с помощью SMPH ВПЧ AP205, FELD1, FELD1-15aa и FD12-15aa соответственно, полученные согласно методу, описанному в примере 5, инкубировали с ТСЕР (фирма Pierce, Perbio Science) в эквимольных количествах в течение 30 мин при комнатной температуре.

Слитые белки Fe1 d1 добавляли в 5-кратном молярном избытке к 143 мкМ раствору дериватизированных с помощью SMPH ВПЧ AP205. Реакционные смеси инкубировали в течение 4 ч при комнатной температуре при встряхивании.

Сочетание слитых белков Fe1 d1 с повторно собранной ВПЧ AP205 (которую получали согласно методу, описанному в примере 2) осуществляли практически аналогично описанному выше методу.

Пример 10

Получение композиции, предлагаемой в изобретении, на основе бактериофага Q β 60 л культуры штамма E.coli AB259 (5×10^7 клеток/мл) выращивали в течение 2-3 ч при 37°C при интенсивной аэрации (1 объем воздуха/объем культуры/мин), получая культуру с плотностью клеток примерно $2-4 \times 10^9$ клеток/мл. Осуществляли инокуляцию очищенным лизатом фага Q β с множественностью заражения 5 и добавляли CaCl₂ до конечной концентрации 2,2 мМ. После 5-минутной фазы адсорбции аэрацию интенсифицировали (1,5 объема воздуха /объем культуры/ мин). Клетки выращивали в течение еще 3 ч до достижения стабильного значения ОП_{650 нм}, получая $4-6 \times 10^{12}$ фаговых частиц в культуре. Их очищали следующим образом. E.coli лизировали, добавляя 10 мл CHCl₃ / 1 л культуры, 0,1 мг лизоцима / 1 л культуры и ЭДТК до конечной концентрации 20 мМ. Лизат осветляли путем центрифугирования в проточной центрифуге с охлаждением, для седиментации фаговых частиц использовали сульфат аммония (500 г/л, выход примерно 66% от

насыщения). Суспензию сначала сливали и осадок выделяли путем центрифугирования в течение 30 мин на центрифуге типа Janetzki K26, ротор W.R. 6×500 мл при 6000 об/мин или на центрифуге типа Beckman J21 C, ротор JA-10. Дебрис повторно солюбилизировали в NT-буфере (0,15M NaCl, 0,1% триптона) и освещали центрифугированием. Супернатант осаждали сульфатом аммония (добавляли 500 г/л, примерно 66% от насыщения). Осадок выделяли центрифугированием, повторно солюбилизировали в NT-буфере и освещали вновь центрифугированием. Фаговые частицы выделяли из образовавшегося супернатанта путем ультрацентрифугирования в течение 3,5 ч, используя ротор типа Beckman 35 при 32000 об/мин. Осажденные фаги повторно суспендировали в NT-буфере и очищали ультрацентрифугированием с использованием общепринятого непрерывного градиента CsCl. Центрифугирование осуществляли с использованием ротора типа Beckman Ti-70 (8×38,5) при 55000 об/мин в течение 20 ч. Затем фаговые частицы подвергали диализу в противотоке буфера, содержащего 20 мМ Hepes, 150 мМ NaCl, pH 7,4, который использовали на стадиях химического сшивания согласно методу, описанному в примере 7.

Пример 11

Получение композиции, предлагаемой в изобретении, на основе фага GA 12 л культуры штамма E.coli Q 13 Hfr RNASse Г в среде M9, содержащей 2% гидролизата казеина, 0,5% дрожжевого экстракта, 0,2% глюкозы, выращивали до достижения значения $ОП_{540\text{ нм}}$ 0,6-0,7, что соответствовало примерно 2×10^8 клеток/мл, и заражали фагом GA с множественностью заражения 10-20. Культуру выращивали в течение еще 2,5-3 ч при 37°C, получая примерно 10 фаговых частиц во всей культуре. Клетки лизировали, добавляя 1-2% об% $CHCl_3$, и инкубировали культуру в течение 15 мин. Лизат освещали путем центрифугирования в течение 30 мин при 5000 об/мин с использованием ротора типа Janetzi K26. Фаговые частицы осаждали из культуральных сред сульфатом аммония (60% насыщения) в течение нескольких дней при 4°C. Суспензию сначала отбрасывали и осадок выделяли центрифугированием в течение 30 мин при 6000 об/мин с использованием ротора типа Janetzki K26. Дебрис повторно суспендировали в NET-буфере (20 мМ Трис, pH 7,8, 150 мМ NaCl, 5 мМ ЭДТК) и частицы экстрагировали путем нескольких циклов центрифугирования и ресуспендирования в небольших порциях NET-буфера. Объединяли группы, содержащие капсиды, и осаждали 60%-ным сульфатом аммония. Частицы, ресуспендированные в NET-буфере, очищали трижды на колонке, заполненной Сефарозой 4 В, с последующим использованием двух градиентов сахарозы. В целом, для создания градиента приготавливали в центрифужных пробирках 7 мл 50%-ной, 7 мл 43%-ной, 7 мл 36%-ной, 7 мл 29%-ной и 7 мл 22 мас.-%-ной сахарозы в NET-буфере. Раствор фага (в NET-буфере) наслаивали на градиент и центрифугировали в течение 17 ч с использованием ротора типа Beckman SW 28 при 25000 об/мин. Содержащие капсиды фракции объединяли и отделяли от сахарозы гель-фильтрацией на колонке, заполненной Сефарозой 4 В. Затем фаговые частицы подвергали диализу в противотоке воды и лиофилизировали для дальнейшего применения.

Условия сочетания слитых белков Fe1 d1 с бактериофагом Q β или GA практически аналогичны условиям реакции сочетания с ВПЧ Q β , описанным в примере 7.

Пример 12

Слитые белки Q β -Fe1 d1 обладают высокой иммуногенностью для мышей. Мышей линии BALB/c иммунизировали подкожно (sc) 50 мкг конъюгата

Q β -FELD1, который получали согласно методу, описанному в примере 7, или 50 мкг Q β , смешанного с рекомбинантным Fe1 d1 (который получали согласно методу, описанному в примере 5) в дни 0, 14 и 21 и брали образцы крови в дни 0, 21 и 28. Специфические для Fe1 d1 антитела оценивали с помощью ELISA, используя для 5 сенсibilизации FELD1 (10 мкг/мл). В целом метод состоял в следующем: использовали 96-луночный планшет типа F96, который предварительно сенсibilизировали при 4°C в течение ночи 10 мкг/мл FELD1 в 0,1М NaHCO₃ pH 9,6. Планшеты отмывали четыре раза 3ФР-Твин 20 и основной уровень снижали путем 10 инкубации планшетов в течение 2 ч при 37°C в блокирующем буфере (2% БСА (фирма Sigma) в 3ФР-Твин 20). Сыворотку разводили буфером для разведения сыворотки (2% БСА, 1% ФТС в 3ФР-Твин 20). Осуществляли последовательные двукратные разведения и инкубировали в течение 2 ч при комнатной температуре на шейкере для ELISA-планшетов. Планшеты отмывали 5 раз и инкубировали с 15 разведенным в соотношении 1:1000 идентифицирующим антителом (антитело к мышинному IgG, конъюгированное с пероксидазой из хрена (HRPO) (фирма Sigma)) в течение 1 ч при комнатной температуре. Планшеты отмывали 5 раз 3ФР-Твин 20 и обнаружение осуществляли с использованием раствора субстрата OPD (0,066М Na₂HPO₄, 0,035М лимонная кислота, pH 5,0, содержащий 10 мг OPD (фирма Fluka) и 8 20 мкл 30%-ной H₂O₂ (фирма Fluka) на 25 мл) и 5% H₂SO₄ в H₂O в качестве стоп-раствора. Абсорбцию оценивали с помощью ридера для ELISA при 450 нм и рассчитывали средние арифметические значения и стандартные отклонения (СКО) с помощью программы EXCEL (фирма Microsoft).

Для мышей, иммунизированных Q β -FELD1, уровень абсорбции, составляющий 25 половину от максимального, был равен 120000 и 75000 в день 21 и день 28 соответственно. В противоположность этому у мышей, иммунизированных не сшитой смесью Q β /FELD 1, обнаружены более низкие титры, составляющие 7000 30 и 6000 в день 21 и день 28 соответственно.

Пример 13

Иммунизация мышей с использованием квасцов в качестве адъюванта

7-8-недельных самок мышей линии Balb/c вакцинировали трижды (в день 0, 14 35 и 28) 50 мкг вакцины, содержащей конъюгат: известная из прототипов ВПЧ Q β - FELD1-НС. Вакцины разводили в 200 мкл стерильного 3ФР или 100 мкл 3ФР и 100 мкл AluGel-S (фирма Serva) соответственно и вводили подкожно в левую и правую паховую область.

Образцы сыворотки получали в день 14, 21, 28, 42, 56, 84 и 112. Антитела, 40 специфические для встречающегося в естественных условиях Fe1 d1, FELD-НС и ВПЧ Q β , определяли с помощью ELISA.

Титрационные планшеты сенсibilизировали в течение ночи 1 мкг/мл встречающегося в естественных условиях Fe1 d1 (nFe1 d1, фирма Indoors biotechnologies), 10 мг/мл FELD1-НС и 10 мг/мл ВПЧ Q β соответственно. После 45 отмывки (0,05% Твин 20/3ФР) и блокирования 2% БСА в 3ФР, добавляли сыворотку с использованием различных разведений в 2% БСА/1% ФТС/3ФР.

Затем осуществляли ELISA стандартным методом. Вакцины, содержащие конъюгат ВПЧ Q β -FELD1-НС, индуцировали пролонгированный высокий 50 специфический в отношении Fe1 d1 гуморальный иммунный ответ на встречающийся в естественных условиях белок и на FELD1. Титр антител оказался выше в присутствии квасцов по сравнению с вариантом без квасцов (таблица 2).

Таблица 2

Даты	С квасцами		Без квасцов	
	nFe1 d1	FELD1-НС	nFe1 d1	FELD1-НС
день 13	15984	53939	3394	7871
день 20	100311	203636	38980	77323
день 27	173190	368716	38177	56836
день 42	240173	419072	88953	170377
день 56	228500	492520	65370	163093
день 84	157009	219834	59603	115049
день 112	127745	203719	62290	116132

Пример 14

FELD1, сшитый с Q β , резко снижает аллергенный потенциал in vitro

Для оценки способности Q β -FELD1-НС запускать аллергическую реакцию in vitro, из крови трех доноров, страдающих аллергией на кошек, выделяли базофилы. У индивидуума, страдающего аллергией на кошек, эти базофилы сенсибилизированы специфическим для Fe1 d1 IgE и реагируют на стимуляцию аллергеном повышающей регуляцией CD63. В связи с вышесказанным базофилы страдающего аллергией индивидуума стимулировали определенными количествами Q β -FELD1-НС или только FELD1-НС и оценивали с помощью проточной цитометрии повышающую регуляцию CD63. В то время как FELD1-НС (полученный согласно методу, описанному в примере 5) провоцировал повышающую регуляцию CD63 при использовании самого низкого из тестируемых разведений (примерно 0,2 нг/мл), Q β -FELD1-НС (полученный согласно методу, описанному в примере 7) обладал резко сниженным аллергенным потенциалом и требовалось использовать в 100-1000 раз большие его количества (примерно 70 нг/мл) по сравнению с FELD1-НС для получения аналогичной реакции базофилов.

Тест, аналогичный описанному, повторяли с использованием слитых белков FELD-15aa-НС и FD12-15aa-НС либо индивидуально, либо сшитых с Q β . Эти результаты представлены на фиг.2. Все указанные слитые белки Fe1 d1, когда они были сшиты с Q β , обладали резко сниженным аллергенным потенциалом.

Пример 15

FELD1, сшитый с Q β , не провоцирует инъекционную кожную пробу у страдающего аллергией добровольца

Если аллергены интродуцируют путем инъекции в кожу страдающего аллергией индивидуума, то возникает местный отек в течение примерно 20 мин из-за активации находящихся в коже тучных клеток. В настоящем описании кожную пробу применяли для определения аллергенного потенциала Q β -FELD1-НС (полученного согласно методу, описанному в примере 7). Определенные количества Q β -FELD1-НС или соответствующие количества FELD1-НС (полученного согласно методу, описанному в примере 5) интродуцировали в кожу страдающего аллергией на кошек индивидуума и оценивали кожную реакцию через 20 мин. Q β -FELD1-НС не обладал способностью провоцировать кожную реакцию, в то время как FELD1-НС обладал активностью при использовании в 100 раз более низких концентраций (таблица 3)

Таблица 3

Соответствующие количества FELD1-НС, присутствующие в обоих препаратах		
Разведение	FELD1-НС	Q β -FELD1-НС
неразведенный	+++	-
1:10	++	-
1:100	+	-

1:1000	-	-
--------	---	---

Пример 16

Иммунизация страдающего аллергией индивидуума Q β -FELD1-НС снижает реактивность инъекционной кожной пробы

Для оценки способности Q β -FELD-НС облегчать клинические симптомы у пациента, страдающего аллергией на кошек, вакцинировали 17 мкг Q β -FELD1-НС (полученного согласно методу, описанному в примере 7) в день 0 (3 инъекции по 2, 5 и 10 мкг), 40 мкг в день 7 (3 инъекции по 10, 10 и 20 мкг) и 50 мкг в день 14 (2 инъекции по 10 и 40 мкг). Осуществляли инъекционные кожные пробы с использованием стандартизованного экстракта кошачьего аллергена в день 0, 14 и 21 и количественно оценивали реакцию по диаметру центральной припухлости (фиг.3). Через 3 недели требовались в 1000 раз более высокие концентрации аллергена для индукции клинических симптомов при инъекционной кожной пробе по сравнению с количеством, которое первоначально являлось достаточным для индукции симптома при инъекционной пробе.

Пример 17

Иммунизация страдающего аллергией индивидуума Q β -FELD1-НС снижает симптомы назальной провокационной пробы

Для оценки способности Q β -FELD-НС облегчать клинические симптомы пациента, страдающего аллергией на кошек, вакцинировали 17 мкг Q β -FELD1-НС (полученного согласно методу, описанному в примере 7) в день 0 (3 инъекции по 2, 5 и 10 мкг), 40 мкг в день 7 (3 инъекции по 10, 10 и 20 мкг) и 50 мкг в день 14 (2 инъекции по 10 и 40 мкг). Осуществляли назальные провокационные пробы с использованием стандартизованного экстракта кошачьего аллергена в дни 0, 14 и 21 и клинические симптомы оценивали для каждой из возрастающих доз (фиг.4А) и определяли общий балл аллергии (как показано на фиг.4Б). Через 3 недели требовались в 100-1000 раз более высокие концентрации аллергена для индукции клинических симптомов, и общий балл заметно снижался.

Пример 18

Упаковка иммуностимулирующих нуклеиновых кислот в ВПЧ Q β

Разобранный на части и очищенный оболочечный белок Q β получали согласно методу, описанному в примере 1 (А) и (Б). Повторная сборка: (3-меркаптоэтанол добавляли к 10 мл содержащей димеры фракции до конечной концентрации 10% и добавляли 300 мкл раствора олигодезоксинуклеотида (CrG)₂₀OpA, содержащего 12,3 нмоля олигонуклеотида. Смесь для повторной сборки сначала подвергали диализу в противотоке 30 мл NET-буфера (20 мМ Трис-НСl, рН 7,8 с 5 мМ ЭДТК и 150 мМ NaCl), содержащему 10% β -меркаптоэтанола, в течение 2 ч при 4°C, а затем подвергали непрерывному диализу со скоростью потока NET-буфера 8 мл/ч в течение 4 дней при 4°C. Затем смесь для повторной сборки обессоливали в противотоке воды путем диализа с шестью заменами буфера (4×100 мл, 2×1 л).

Сочетание слитых белков Fe1 d1 с ВПЧ Q β , внутри которой упакован CrG, осуществляли практически аналогично методу, описанном в примере 7.

Пример 19

Специфическая для Fe1 d1 сыворотка ингибирует индуцированную слитыми белками Fe1 d1 дегрануляцию базофилов in vitro

Для оценки способности специфических для Fe1 d1 антител типа IgG ингибировать дегрануляцию базофилов индивидуума, страдающего аллергией, стимулировали определенным количеством FELD1-НС или FELD1-15aa-НС, предварительно

инкубированным с серийными разведениями понижающихся концентраций IgG, выделенных из кроликов, которые иммунизировали Q β -FELD1-НС. Повышающую регуляцию CD63 оценивали с помощью проточной цитометрии. Антитела к Fe1 d1 типа IgG блокировали индуцируемую Fe1 d1 дегрануляцию во всех тестируемых концентрациях, в то время как контрольный IgG не оказывал никакого действия (таблица 4).

Таблица 4		
Образцы	FELD1-НС Процент дегрануляции	FELD1-15aa-НС Процент дегрануляции
без IgG	33	33
специфический для Fe1 d1 IgG (200 нг/мл)	1,9	1,6
специфический для Fe1 d1 IgG (100 нг/мл)	5,2	2,1
специфический для Fe1 d1 IgG (50 нг/мл)	8,2	2,3
специфический для Fe1 d1 IgG (25 нг/мл)	10,6	4,2
Образцы	FELD1-НС Процент дегрануляции	FELD1-15aa-НС Процент дегрануляции
d1 IgG (25 нг/мл)		
неспецифический IgG	35	29
без стимуляции Fe1 d1	1,2	1,2

Пример 20

Иммунизация страдающих аллергией на Fe1 d1 мышей с помощью Q β -FELD1-НС

Экспериментальную модель астмы в результате аллергического воспаления

дыхательных путей у мышей использовали для оценки воздействия вакцинации против встречающегося в естественных условиях аллергена Fe1 d1 на гуморальный иммунный ответ в виде IgE в сыворотке и БАЛ (бронхоальвеолярный лаваж) на мышцах линии BALB/c. По 5 мышей в группе сенсibilизировали путем внутрибрюшинной инъекции 1 мкг встречающегося в естественных условиях Fe1 d1 в AlumGel-S в день 0. Мышей подвергали подкожной вакцинации в день 35 и 49 либо 50 мкг только Q β , либо 50 мкг Q β -FELD1-НС перед осуществлением двух последовательных интраназальных контрольных заражений в день 63 и день 70. Через 5 дней после последнего интраназального контрольного заражения мышей умерщвляли и брали образцы сыворотки и БАЛЖ (жидкость бронхоальвеолярного лаважа) для анализа гуморального иммунного ответа (титры IgE-подкласса) с помощью ELISA.

Планшеты для ELISA сенсibilизировали крысиным МАт к IgE (2 мкг/мл), разведенным в карбонатном буфере, в течение ночи при 4°C. После блокирования планшетов с помощью 3ФР/5% БСА в течение 2 ч планшеты инкубировали в течение еще 2 ч либо с сывороткой (первая лунка, предварительное разведение 1:100, затем с использованием 8 стадий разведения 1:3) или БАЛ (первая лунка, чистое содержимое БАЛ, затем с использованием 8 стадий разведения 1:3) из организма сенсibilизированных, вакцинированных, подвергнутых контрольному заражению антигеном мышей. После инкубации образца в течение 2 ч IgE в сыворотке и БАЛ выявляли с помощью крысиного антитела к мышному IgE, меченного пероксидазой из хрена (HRP), перед выявлением с помощью субстрата OPD.

Таблица 5				
Группа	Сыворотка (д75)		БАЛ (д75)	
	Титр при ОП ₅₀	Снижение (в %)	Титр при ОП ₅₀	Снижение (в %)
Вакцинированная Q β	1036	-	15	-

Вакцинированная Q β -Fe1 d1	49	95	0	100
-----------------------------------	----	----	---	-----

Формула изобретения

1. Композиция, содержащая:

(а) коровую частицу, которая несет по меньшей мере один первый сайт присоединения, где коровая частица представляет собой вирусоподобную частицу (ВПЧ) РНК содержащего бактериофага,

(б) по меньшей мере один антиген, который несет по меньшей мере один второй сайт присоединения, где по меньшей мере один антиген представляет собой белок Fe1 d1, где указанный белок Fe1 d1 представляет собой слитый белок, который содержит цепь 1 Fe1 d1 и цепь 2 Fe1 d1, где указанная цепь 2 Fe1 d1 связана посредством ее С-конца с N-концом указанной цепи 1 Fe1 d1 непосредственно или через спейсер, и где (а) и (б) ковалентно связаны с помощью по меньшей мере одного первого и по меньшей мере одного второго сайта присоединения.

2. Композиция по п.1, в которой указанная цепь 2 Fe1 d1 связана посредством ее С-конца с N-концом указанной цепи 1 Fe1 d1 через спейсер, где спейсер состоит из аминокислотной последовательности, которая имеет 1-20 аминокислотных остатков.

3. Композиция по п.1, в которой указанная цепь 2 Fe1 d1 связана посредством ее С-конца с N-концом указанной цепи 1 Fe1 d1 через спейсер, где спейсер состоит из аминокислотной последовательности, которая имеет 10-20 аминокислотных остатков.

4. Композиция по п.1, в которой указанная цепь 2 Fe1 d1 связана посредством ее С-конца с N-концом указанной цепи 1 Fe1 d1 через спейсер, где спейсер состоит из аминокислотной последовательности, которая имеет 15 аминокислотных остатков.

5. Композиция по п.1, в которой указанная цепь 2 Fe1 d1 связана посредством ее С-конца с N-концом указанной цепи 1 Fe1 d1 через спейсер и где спейсером является (GGGGS)₃.

6. Композиция по п.1, в которой слитый белок содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, включающей:

(а) SEQ ID NO:24;

(б) SEQ ID NO:54; и

(в) SEQ ID NO:55.

7. Композиция по п.1, в которой по меньшей мере один антиген является белком Fe1 d1, и где белок Fe1 d1 выбирают из группы, включающей:

(а) SEQ ID NO:24;

(б) SEQ ID NO:54; и

(в) SEQ ID NO:55.

8. Композиция по п.1, в которой указанная цепь 2 Fe1 d1 связана посредством ее С-конца с N-концом указанной цепи 1 Fe1 d1 через спейсер и где белок Fe1 d1 является SEQ ID NO:55.

9. Композиция по п.1, в которой цепь 1 Fe1 d1 содержит последовательность SEQ ID NO:22 или гомологичную ей последовательность, где гомологичная последовательность идентична SEQ ID NO:22 более чем на 80%, предпочтительно более чем на 90% или еще более предпочтительно более чем на 95% и наиболее предпочтительно цепь 1 Fe1 d1 состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO:22.

10. Композиция по п.1, в которой цепь 2 Fe1 d1 содержит последовательность SEQ

ID NO:23, SEQ ID NO:25 или SEQ ID NO:26, или гомологичную им последовательность, где гомологичная последовательность идентична SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:25 или SEQ ID NO:26 более чем на 80%, предпочтительно более чем на 90%, еще более предпочтительно более чем на 95% и наиболее предпочтительно
 5 цепь 2 Fe1 d1 состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO:23.

11. Композиция по п.1, в которой РНК содержащий бактериофаг выбран из Q β , fr, GA или AP205.

10 12. Композиция по п.1, в которой РНК содержащий бактериофаг представляет собой Q β .

13. Композиция по п.1, в которой указанная вирусоподобная частица РНК содержащего бактериофага включает коровый протеин SEQ ID NO:1.

14. Композиция по п.1, в которой первый сайт присоединения содержит или
 15 предпочтительно представляет собой аминокислотную группу, предпочтительно аминокислотную лизина.

15. Композиция по п.1, в которой второй сайт присоединения содержит или предпочтительно представляет собой сульфгидрильную группу, предпочтительно сульфгидрильную группу цистеина.

20 16. Композиция по п.1, в которой первый сайт присоединения содержит собой аминокислотную группу и в которой второй сайт присоединения содержит сульфгидрильную группу, где предпочтительно аминокислотная группа является аминокислотной лизина и сульфгидрильная группа является сульфгидрильной группой цистеина.

25 17. Композиция по п.1, где указанная вирусоподобная частица, которая несет по меньшей мере один указанный первый сайт присоединения, связана с по меньшей мере одним белком Fe1 d1, который несет по меньшей мере один указанный второй сайт присоединения, с помощью по меньшей мере одной непептидной ковалентной связи.

30 18. Композиция по п.1, дополнительно содержащая линкер, в которой предпочтительно линкер слит с С-концом белка Fe1 d1.

19. Композиция по п.18, где указанный линкер включает указанный второй сайт присоединения.

20. Композиция по п.12, где указанный антиген является SEQ ID NO:55.

35 21. Композиция по п.20, в которой первый сайт присоединения является аминокислотной лизина, и второй сайт присоединения является сульфгидрильной группой цистеина.

40 22. Вакцина, содержащая композицию по пп.1-21, где предпочтительно вакцина дополнительно содержит по меньшей мере один адъювант.

23. Фармацевтическая композиция, содержащая:

(а) композицию по одному из пп.1-21; и

(б) приемлемый фармацевтический носитель.

45 24. Способ получения композиции по одному из пп.1-21, заключающийся в том, что:

(а) получают коровую частицу, которая несет по меньшей мере один первый сайт присоединения, где коровая частица представляет собой вирусоподобную частицу (ВПЧ) РНК содержащего бактериофага,

50 (б) получают по меньшей мере один антиген, который несет по меньшей мере один второй сайт присоединения, где антиген представляет собой белок Fe1 d1, где указанный белок Fe1 d1 представляет собой слитый белок, который содержит цепь 1 Fe1 d1 и цепь 2 Fe1 d1, где указанная цепь 2 Fe1 d1 связана посредством ее С-конца

с N-концом указанной цепи 1 Fe1 d1 непосредственно или через спейсер, и

(в) связывают коровую частицу и по меньшей мере один антиген с получением композиции, в которой по меньшей мере один антиген и коровая частица связаны с помощью по меньшей мере одного первого и по меньшей мере одного второго сайта присоединения.

25. Способ лечения аллергии на кошек, заключающийся в том, что вводят композицию по одному из пп.1-21 или вакцину по п.22 человеку или млекопитающему, кроме человека, где предпочтительно млекопитающее, кроме человека, представляет собой собаку или кошку, и где дополнительно предпочтительно указанная композиция вводится посредством инъекции, ингаляции, перорально, внутримышечно, через вену, трансдермально, через нос или подкожно.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110>

Bachmann, Martin F
 Monika, BAUER F
 Dietmeier, Klaus
 Schmitz, Nicole
 Uzinger, Stefan

<120> Белки, слитые с кошачьим аллергеном, и их применение

<130> P1048PC00

<150> 60/662,918

<151> 2005-03-18

<160> 69

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 132

<212> PRT

<213> бактериофаг Q β

<400> 1

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

Gln	Thr	Leu	Val	Leu	Asn	Pro	Arg	Gly	Val	Asn	Pro	Thr	Asn	Gly	Val
			20					25					30		

Ala	Ser	Leu	Ser	Gln	Ala	Gly	Ala	Val	Pro	Ala	Leu	Glu	Lys	Arg	Val
		35					40						45		

Thr	Val	Ser	Val	Ser	Gln	Pro	Ser	Arg	Asn	Arg	Lys	Asn	Tyr	Lys	Val
	50					55					60				

Gln	Val	Lys	Ile	Gln	Asn	Pro	Thr	Ala	Cys	Thr	Ala	Asn	Gly	Ser	Cys
65					70					75				80	

Asp Pro Ser Val Thr Arg Gln Ala Tyr Ala Asp Val Thr Phe Ser Phe
85 90 95

Thr Gln Tyr Ser Thr Asp Glu Glu Arg Ala Phe Val Arg Thr Glu Leu
100 105 110

Ala Ala Leu Leu Ala Ser Pro Leu Leu Ile Asp Ala Ile Asp Gln Leu
115 120 125

Asn Pro Ala Tyr
130

<210> 2
<211> 329
<212> PRT
<213> бaктepиoфaг Qβ

<400> 2

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

Lys Gln Thr Leu Val Leu Asn Pro Arg Gly Val Asn Pro Thr Asn Gly
20 25 30

Val Ala Ser Leu Ser Gln Ala Gly Ala Val Pro Ala Leu Glu Lys Arg
35 40 45

Val Thr Val Ser Val Ser Gln Pro Ser Arg Asn Arg Lys Asn Tyr Lys
50 55 60

Val Gln Val Lys Ile Gln Asn Pro Thr Ala Cys Thr Ala Asn Gly Ser
65 70 75 80

Cys Asp Pro Ser Val Thr Arg Gln Ala Tyr Ala Asp Val Thr Phe Ser
85 90 95

Phe Thr Gln Tyr Ser Thr Asp Glu Glu Arg Ala Phe Val Arg Thr Glu
 100 105 110

Leu Ala Ala Leu Leu Ala Ser Pro Leu Leu Ile Asp Ala Ile Asp Gln
 115 120 125

Leu Asn Pro Ala Tyr Trp Thr Leu Leu Ile Ala Gly Gly Gly Ser Gly
 130 135 140

Ser Lys Pro Asp Pro Val Ile Pro Asp Pro Pro Ile Asp Pro Pro Pro
 145 150 155 160

Gly Thr Gly Lys Tyr Thr Cys Pro Phe Ala Ile Trp Ser Leu Glu Glu
 165 170 175

Val Tyr Glu Pro Pro Thr Lys Asn Arg Pro Trp Pro Ile Tyr Asn Ala
 180 185 190

Val Glu Leu Gln Pro Arg Glu Phe Asp Val Ala Leu Lys Asp Leu Leu
 195 200 205

Gly Asn Thr Lys Trp Arg Asp Trp Asp Ser Arg Leu Ser Tyr Thr Thr
 210 215 220

Phe Arg Gly Cys Arg Gly Asn Gly Tyr Ile Asp Leu Asp Ala Thr Tyr
 225 230 235 240

Leu Ala Thr Asp Gln Ala Met Arg Asp Gln Lys Tyr Asp Ile Arg Glu
 245 250 255

Gly Lys Lys Pro Gly Ala Phe Gly Asn Ile Glu Arg Phe Ile Tyr Leu
 260 265 270

Lys Ser Ile Asn Ala Tyr Cys Ser Leu Ser Asp Ile Ala Ala Tyr His
 275 280 285

Ala Asp Gly Val Ile Val Gly Phe Trp Arg Asp Pro Ser Ser Gly Gly
290 295 300

Ala Ile Pro Phe Asp Phe Thr Lys Phe Asp Lys Thr Lys Cys Pro Ile
305 310 315 320

Gln Ala Val Ile Val Val Pro Arg Ala
325

<210> 3
<211> 129
<212> PRT
<213> бaктерioфaг R17

<400> 3

Ala Ser Asn Phe Thr Gln Phe Val Leu Val Asn Asp Gly Gly Thr Gly
1 5 10 15

Asn Val Thr Val Ala Pro Ser Asn Phe Ala Asn Gly Val Ala Glu Trp
20 25 30

Ile Ser Ser Asn Ser Arg Ser Gln Ala Tyr Lys Val Thr Cys Ser Val
35 40 45

Arg Gln Ser Ser Ala Gln Asn Arg Lys Tyr Thr Ile Lys Val Glu Val
50 55 60

Pro Lys Val Ala Thr Gln Thr Val Gly Gly Val Glu Leu Pro Val Ala
65 70 75 80

Ala Trp Arg Ser Tyr Leu Asn Met Glu Leu Thr Ile Pro Ile Phe Ala
85 90 95

Thr Asn Ser Asp Cys Glu Leu Ile Val Lys Ala Met Gln Gly Leu Leu
100 105 110

Lys Asp Gly Asn Pro Ile Pro Ser Ala Ile Ala Ala Asn Ser Gly Ile
 115 120 125

Tyr

<210> 4
 <211> 130
 <212> PRT
 <213> бактериофаг fr

<400> 4

Met Ala Ser Asn Phe Glu Glu Phe Val Leu Val Asp Asn Gly Gly Thr
 1 5 10 15

Gly Asp Val Lys Val Ala Pro Ser Asn Phe Ala Asn Gly Val Ala Glu
 20 25 30

Trp Ile Ser Ser Asn Ser Arg Ser Gln Ala Tyr Lys Val Thr Cys Ser
 35 40 45

Val Arg Gln Ser Ser Ala Asn Asn Arg Lys Tyr Thr Val Lys Val Glu
 50 55 60

Val Pro Lys Val Ala Thr Gln Val Gln Gly Gly Val Glu Leu Pro Val
 65 70 75 80

Ala Ala Trp Arg Ser Tyr Met Asn Met Glu Leu Thr Ile Pro Val Phe
 85 90 95

Ala Thr Asn Asp Asp Cys Ala Leu Ile Val Lys Ala Leu Gln Gly Thr
 100 105 110

Phe Lys Thr Gly Asn Pro Ile Ala Thr Ala Ile Ala Ala Asn Ser Gly
 115 120 125

Ile Tyr
130

<210> 5
<211> 130
<212> PRT
<213> бактериофаг GA

<400> 5

Met Ala Thr Leu Arg Ser Phe Val Leu Val Asp Asn Gly Gly Thr Gly
1 5 10 15

Asn Val Thr Val Val Pro Val Ser Asn Ala Asn Gly Val Ala Glu Trp
20 25 30

Leu Ser Asn Asn Ser Arg Ser Gln Ala Tyr Arg Val Thr Ala Ser Tyr
35 40 45

Arg Ala Ser Gly Ala Asp Lys Arg Lys Tyr Ala Ile Lys Leu Glu Val
50 55 60

Pro Lys Ile Val Thr Gln Val Val Asn Gly Val Glu Leu Pro Gly Ser
65 70 75 80

Ala Trp Lys Ala Tyr Ala Ser Ile Asp Leu Thr Ile Pro Ile Phe Ala
85 90 95

Ala Thr Asp Asp Val Thr Val Ile Ser Lys Ser Leu Ala Gly Leu Phe
100 105 110

Lys Val Gly Asn Pro Ile Ala Glu Ala Ile Ser Ser Gln Ser Gly Phe
115 120 125

Tyr Ala
130

<210> 6
 <211> 132
 <212> PRT
 <213> бактериофаг SP

<400> 6

Met Ala Lys Leu Asn Gln Val Thr Leu Ser Lys Ile Gly Lys Asn Gly
 1 5 10 15

Asp Gln Thr Leu Thr Leu Thr Pro Arg Gly Val Asn Pro Thr Asn Gly
 20 25 30

Val Ala Ser Leu Ser Glu Ala Gly Ala Val Pro Ala Leu Glu Lys Arg
 35 40 45

Val Thr Val Ser Val Ala Gln Pro Ser Arg Asn Arg Lys Asn Phe Lys
 50 55 60

Val Gln Ile Lys Leu Gln Asn Pro Thr Ala Cys Thr Arg Asp Ala Cys
 65 70 75 80

Asp Pro Ser Val Thr Arg Ser Ala Phe Ala Asp Val Thr Leu Ser Phe
 85 90 95

Thr Ser Tyr Ser Thr Asp Glu Glu Arg Ala Leu Ile Arg Thr Glu Leu
 100 105 110

Ala Ala Leu Leu Ala Asp Pro Leu Ile Val Asp Ala Ile Asp Asn Leu
 115 120 125

Asn Pro Ala Tyr
 130

<210> 7
 <211> 329
 <212> PRT

<213> бaктерioфaг SP

<400> 7

Ala Lys Leu Asn Gln Val Thr Leu Ser Lys Ile Gly Lys Asn Gly Asp
 1 5 10 15

Gln Thr Leu Thr Leu Thr Pro Arg Gly Val Asn Pro Thr Asn Gly Val
 20 25 30

Ala Ser Leu Ser Glu Ala Gly Ala Val Pro Ala Leu Glu Lys Arg Val
 35 40 45

Thr Val Ser Val Ala Gln Pro Ser Arg Asn Arg Lys Asn Phe Lys Val
 50 55 60

Gln Ile Lys Leu Gln Asn Pro Thr Ala Cys Thr Arg Asp Ala Cys Asp
 65 70 75 80

Pro Ser Val Thr Arg Ser Ala Phe Ala Asp Val Thr Leu Ser Phe Thr
 85 90 95

Ser Tyr Ser Thr Asp Glu Glu Arg Ala Leu Ile Arg Thr Glu Leu Ala
 100 105 110

Ala Leu Leu Ala Asp Pro Leu Ile Val Asp Ala Ile Asp Asn Leu Asn
 115 120 125

Pro Ala Tyr Trp Ala Ala Leu Leu Val Ala Ser Ser Gly Gly Gly Asp
 130 135 140

Asn Pro Ser Asp Pro Asp Val Pro Val Val Pro Asp Val Lys Pro Pro
 145 150 155 160

Asp Gly Thr Gly Arg Tyr Lys Cys Pro Phe Ala Cys Tyr Arg Leu Gly
 165 170 175

Ser Ile Tyr Glu Val Gly Lys Glu Gly Ser Pro Asp Ile Tyr Glu Arg
180 185 190

Gly Asp Glu Val Ser Val Thr Phe Asp Tyr Ala Leu Glu Asp Phe Leu
195 200 205

Gly Asn Thr Asn Trp Arg Asn Trp Asp Gln Arg Leu Ser Asp Tyr Asp
210 215 220

Ile Ala Asn Arg Arg Arg Cys Arg Gly Asn Gly Tyr Ile Asp Leu Asp
225 230 235 240

Ala Thr Ala Met Gln Ser Asp Asp Phe Val Leu Ser Gly Arg Tyr Gly
245 250 255

Val Arg Lys Val Lys Phe Pro Gly Ala Phe Gly Ser Ile Lys Tyr Leu
260 265 270

Leu Asn Ile Gln Gly Asp Ala Trp Leu Asp Leu Ser Glu Val Thr Ala
275 280 285

Tyr Arg Ser Tyr Gly Met Val Ile Gly Phe Trp Thr Asp Ser Lys Ser
290 295 300

Pro Gln Leu Pro Thr Asp Phe Thr Gln Phe Asn Ser Ala Asn Cys Pro
305 310 315 320

Val Gln Thr Val Ile Ile Ile Pro Ser
325

<210> 8
<211> 130
<212> PRT
<213> бaктepиoфaг MS2
<400> 8

Met Ala Ser Asn Phe Thr Gln Phe Val Leu Val Asp Asn Gly Gly Thr
1 5 10 15

Gly Asp Val Thr Val Ala Pro Ser Asn Phe Ala Asn Gly Val Ala Glu
20 25 30

Trp Ile Ser Ser Asn Ser Arg Ser Gln Ala Tyr Lys Val Thr Cys Ser
35 40 45

Val Arg Gln Ser Ser Ala Gln Asn Arg Lys Tyr Thr Ile Lys Val Glu
50 55 60

Val Pro Lys Val Ala Thr Gln Thr Val Gly Gly Val Glu Leu Pro Val
65 70 75 80

Ala Ala Trp Arg Ser Tyr Leu Asn Met Glu Leu Thr Ile Pro Ile Phe
85 90 95

Ala Thr Asn Ser Asp Cys Glu Leu Ile Val Lys Ala Met Gln Gly Leu
100 105 110

Leu Lys Asp Gly Asn Pro Ile Pro Ser Ala Ile Ala Ala Asn Ser Gly
115 120 125

Ile Tyr
130

<210> 9
<211> 133
<212> PRT
<213> бактериофаг M11

<400> 9

Met Ala Lys Leu Gln Ala Ile Thr Leu Ser Gly Ile Gly Lys Lys Gly
1 5 10 15

Asp Val Thr Leu Asp Leu Asn Pro Arg Gly Val Asn Pro Thr Asn Gly
20 25 30

Val Ala Ala Leu Ser Glu Ala Gly Ala Val Pro Ala Leu Glu Lys Arg
35 40 45

Val Thr Ile Ser Val Ser Gln Pro Ser Arg Asn Arg Lys Asn Tyr Lys
50 55 60

Val Gln Val Lys Ile Gln Asn Pro Thr Ser Cys Thr Ala Ser Gly Thr
65 70 75 80

Cys Asp Pro Ser Val Thr Arg Ser Ala Tyr Ser Asp Val Thr Phe Ser
85 90 95

Phe Thr Gln Tyr Ser Thr Val Glu Glu Arg Ala Leu Val Arg Thr Glu
100 105 110

Leu Gln Ala Leu Leu Ala Asp Pro Met Leu Val Asn Ala Ile Asp Asn
115 120 125

Leu Asn Pro Ala Tyr
130

<210> 10
<211> 133
<212> PRT
<213> бактериофаг MX1

<400> 10

Met Ala Lys Leu Gln Ala Ile Thr Leu Ser Gly Ile Gly Lys Asn Gly
1 5 10 15

Asp Val Thr Leu Asn Leu Asn Pro Arg Gly Val Asn Pro Thr Asn Gly
20 25 30

Val Ala Ala Leu Ser Glu Ala Gly Ala Val Pro Ala Leu Glu Lys Arg
35 40 45

Val Thr Ile Ser Val Ser Gln Pro Ser Arg Asn Arg Lys Asn Tyr Lys
50 55 60

Val Gln Val Lys Ile Gln Asn Pro Thr Ser Cys Thr Ala Ser Gly Thr
65 70 75 80

Cys Asp Pro Ser Val Thr Arg Ser Ala Tyr Ala Asp Val Thr Phe Ser
85 90 95

Phe Thr Gln Tyr Ser Thr Asp Glu Glu Arg Ala Leu Val Arg Thr Glu
100 105 110

Leu Lys Ala Leu Leu Ala Asp Pro Met Leu Ile Asp Ala Ile Asp Asn
115 120 125

Leu Asn Pro Ala Tyr
130

<210> 11
<211> 330
<212> PRT
<213> Бактериофаг NL95

<400> 11

Met Ala Lys Leu Asn Lys Val Thr Leu Thr Gly Ile Gly Lys Ala Gly
1 5 10 15

Asn Gln Thr Leu Thr Leu Thr Pro Arg Gly Val Asn Pro Thr Asn Gly
20 25 30

Val Ala Ser Leu Ser Glu Ala Gly Ala Val Pro Ala Leu Glu Lys Arg
35 40 45

Val	Thr	Val	Ser	Val	Ala	Gln	Pro	Ser	Arg	Asn	Arg	Lys	Asn	Tyr	Lys
50						55					60				
Val	Gln	Ile	Lys	Leu	Gln	Asn	Pro	Thr	Ala	Cys	Thr	Lys	Asp	Ala	Cys
65					70					75					80
Asp	Pro	Ser	Val	Thr	Arg	Ser	Gly	Ser	Arg	Asp	Val	Thr	Leu	Ser	Phe
				85					90					95	
Thr	Ser	Tyr	Ser	Thr	Glu	Arg	Glu	Arg	Ala	Leu	Ile	Arg	Thr	Glu	Leu
			100					105					110		
Ala	Ala	Leu	Leu	Lys	Asp	Asp	Leu	Ile	Val	Asp	Ala	Ile	Asp	Asn	Leu
		115					120					125			
Asn	Pro	Ala	Tyr	Trp	Ala	Ala	Leu	Leu	Ala	Ala	Ser	Pro	Gly	Gly	Gly
	130						135					140			
Asn	Asn	Pro	Tyr	Pro	Gly	Val	Pro	Asp	Ser	Pro	Asn	Val	Lys	Pro	Pro
145					150					155					160
Gly	Gly	Thr	Gly	Thr	Tyr	Arg	Cys	Pro	Phe	Ala	Cys	Tyr	Arg	Arg	Gly
				165					170					175	
Glu	Leu	Ile	Thr	Glu	Ala	Lys	Asp	Gly	Ala	Cys	Ala	Leu	Tyr	Ala	Cys
				180					185				190		
Gly	Ser	Glu	Ala	Leu	Val	Glu	Phe	Glu	Tyr	Ala	Leu	Glu	Asp	Phe	Leu
				195				200				205			
Gly	Asn	Glu	Phe	Trp	Arg	Asn	Trp	Asp	Gly	Arg	Leu	Ser	Lys	Tyr	Asp
	210					215					220				
Ile	Glu	Thr	His	Arg	Arg	Cys	Arg	Gly	Asn	Gly	Tyr	Val	Asp	Leu	Asp
225						230				235				240	

Ala Ser Val Met Gln Ser Asp Glu Tyr Val Leu Ser Gly Ala Tyr Asp
245 250 255

Val Val Lys Met Gln Pro Pro Gly Thr Phe Asp Ser Pro Arg Tyr Tyr
260 265 270

Leu His Leu Met Asp Gly Ile Tyr Val Asp Leu Ala Glu Val Thr Ala
275 280 285

Tyr Arg Ser Tyr Gly Met Val Ile Gly Phe Trp Thr Asp Ser Lys Ser
290 295 300

Pro Gln Leu Pro Thr Asp Phe Thr Arg Phe Asn Arg His Asn Cys Pro
305 310 315 320

Val Gln Thr Val Ile Val Ile Pro Ser Leu
325 330

<210> 12
<211> 129
<212> PRT
<213> Бактериофаг f2

<400> 12

Ala Ser Asn Phe Thr Gln Phe Val Leu Val Asn Asp Gly Gly Thr Gly
1 5 10 15

Asn Val Thr Val Ala Pro Ser Asn Phe Ala Asn Gly Val Ala Glu Trp
20 25 30

Ile Ser Ser Asn Ser Arg Ser Gln Ala Tyr Lys Val Thr Cys Ser Val
35 40 45

Arg Gln Ser Ser Ala Gln Asn Arg Lys Tyr Thr Ile Lys Val Glu Val
50 55 60

Pro Lys Val Ala Thr Gln Thr Val Gly Gly Val Glu Leu Pro Val Ala
65 70 75 80

Ala Trp Arg Ser Tyr Leu Asn Leu Glu Leu Thr Ile Pro Ile Phe Ala
85 90 95

Thr Asn Ser Asp Cys Glu Leu Ile Val Lys Ala Met Gln Gly Leu Leu
100 105 110

Lys Asp Gly Asn Pro Ile Pro Ser Ala Ile Ala Ala Asn Ser Gly Ile
115 120 125

Tyr

<210> 13
<211> 128
<212> PRT
<213> бактериофаг PP7

<400> 13

Met Ser Lys Thr Ile Val Leu Ser Val Gly Glu Ala Thr Arg Thr Leu
1 5 10 15

Thr Glu Ile Gln Ser Thr Ala Asp Arg Gln Ile Phe Glu Glu Lys Val
20 25 30

Gly Pro Leu Val Gly Arg Leu Arg Leu Thr Ala Ser Leu Arg Gln Asn
35 40 45

Gly Ala Lys Thr Ala Tyr Arg Val Asn Leu Lys Leu Asp Gln Ala Asp
50 55 60

Val Val Asp Cys Ser Thr Ser Val Cys Gly Glu Leu Pro Lys Val Arg
65 70 75 80

Tyr Thr Gln Val Trp Ser His Asp Val Thr Ile Val Ala Asn Ser Thr
 85 90 95

Glu Ala Ser Arg Lys Ser Leu Tyr Asp Leu Thr Lys Ser Leu Val Ala
 100 105 110

Thr Ser Gln Val Glu Asp Leu Val Val Asn Leu Val Pro Leu Gly Arg
 115 120 125

<210> 14
 <211> 131
 <212> PRT
 <213> бактериофаг AP205

<400> 14

Met Ala Asn Lys Pro Met Gln Pro Ile Thr Ser Thr Ala Asn Lys Ile
 1 5 10 15

Val Trp Ser Asp Pro Thr Arg Leu Ser Thr Thr Phe Ser Ala Ser Leu
 20 25 30

Leu Arg Gln Arg Val Lys Val Gly Ile Ala Glu Leu Asn Asn Val Ser
 35 40 45

Gly Gln Tyr Val Ser Val Tyr Lys Arg Pro Ala Pro Lys Pro Glu Gly
 50 55 60

Cys Ala Asp Ala Cys Val Ile Met Pro Asn Glu Asn Gln Ser Ile Arg
 65 70 75 80

Thr Val Ile Ser Gly Ser Ala Glu Asn Leu Ala Thr Leu Lys Ala Glu
 85 90 95

Trp Glu Thr His Lys Arg Asn Val Asp Thr Leu Phe Ala Ser Gly Asn
 100 105 110

Ala Gly Leu Gly Phe Leu Asp Pro Thr Ala Ala Ile Val Ser Ser Asp
 115 120 125

Thr Thr Ala
 130

<210> 15
 <211> 132
 <212> PRT
 <213> искусственная последовательность

<220>
 <223> мутант бактериофага Q β 240

<400> 15

Ala Lys Leu Glu Thr Val Thr Leu Gly Asn Ile Gly Arg Asp Gly Lys
 1 5 10 15

Gln Thr Leu Val Leu Asn Pro Arg Gly Val Asn Pro Thr Asn Gly Val
 20 25 30

Ala Ser Leu Ser Gln Ala Gly Ala Val Pro Ala Leu Glu Lys Arg Val
 35 40 45

Thr Val Ser Val Ser Gln Pro Ser Arg Asn Arg Lys Asn Tyr Lys Val
 50 55 60

Gln Val Lys Ile Gln Asn Pro Thr Ala Cys Thr Ala Asn Gly Ser Cys
 65 70 75 80

Asp Pro Ser Val Thr Arg Gln Lys Tyr Ala Asp Val Thr Phe Ser Phe
 85 90 95

Thr Gln Tyr Ser Thr Asp Glu Glu Arg Ala Phe Val Arg Thr Glu Leu
 100 105 110

Ala Ala Leu Leu Ala Ser Pro Leu Leu Ile Asp Ala Ile Asp Gln Leu
 115 120 125

Asn Pro Ala Tyr
 130

<210> 16

<211> 132

<212> PRT

<213> искусственная последовательность

<220>

<223> мутант бактериофага Q β 243

<400> 16

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

Gln Thr Leu Val Leu Asn Pro Arg Gly Val Asn Pro Thr Asn Gly Val
 20 25 30

Ala Ser Leu Ser Gln Ala Gly Ala Val Pro Ala Leu Glu Lys Arg Val
 35 40 45

Thr Val Ser Val Ser Gln Pro Ser Arg Asn Arg Lys Asn Tyr Lys Val
 50 55 60

Gln Val Lys Ile Gln Asn Pro Thr Ala Cys Thr Ala Asn Gly Ser Cys
 65 70 75 80

Asp Pro Ser Val Thr Arg Gln Lys Tyr Ala Asp Val Thr Phe Ser Phe
 85 90 95

Thr Gln Tyr Ser Thr Asp Glu Glu Arg Ala Phe Val Arg Thr Glu Leu
 100 105 110

Ala Ala Leu Leu Ala Ser Pro Leu Leu Ile Asp Ala Ile Asp Gln Leu
 115 120 125

Asn Pro Ala Tyr
 130

<210> 17

<211> 132

<212> PRT

<213> искусственная последовательность

<220>

<223> мутант бактериофага Q β 250

<400> 17

Ala Arg Leu Glu Thr Val Thr Leu Gly Asn Ile Gly Arg Asp Gly Lys
 1 5 10 15

Gln Thr Leu Val Leu Asn Pro Arg Gly Val Asn Pro Thr Asn Gly Val
 20 25 30

Ala Ser Leu Ser Gln Ala Gly Ala Val Pro Ala Leu Glu Lys Arg Val
 35 40 45

Thr Val Ser Val Ser Gln Pro Ser Arg Asn Arg Lys Asn Tyr Lys Val
 50 55 60

Gln Val Lys Ile Gln Asn Pro Thr Ala Cys Thr Ala Asn Gly Ser Cys
 65 70 75 80

Asp Pro Ser Val Thr Arg Gln Lys Tyr Ala Asp Val Thr Phe Ser Phe
 85 90 95

Thr Gln Tyr Ser Thr Asp Glu Glu Arg Ala Phe Val Arg Thr Glu Leu
 100 105 110

Ala Ala Leu Leu Ala Ser Pro Leu Leu Ile Asp Ala Ile Asp Gln Leu

115

120

125

Asn Pro Ala Tyr

130

<210> 18

<211> 132

<212> PRT

<213> искусственная последовательность

<220>

<223> мутант бактериофага Q β 251

<400> 18

Ala	Lys	Leu	Glu	Thr	Val	Thr	Leu	Gly	Asn	Ile	Gly	Lys	Asp	Gly	Arg
1				5					10					15	

Gln	Thr	Leu	Val	Leu	Asn	Pro	Arg	Gly	Val	Asn	Pro	Thr	Asn	Gly	Val
			20					25					30		

Ala	Ser	Leu	Ser	Gln	Ala	Gly	Ala	Val	Pro	Ala	Leu	Glu	Lys	Arg	Val
		35					40						45		

Thr	Val	Ser	Val	Ser	Gln	Pro	Ser	Arg	Asn	Arg	Lys	Asn	Tyr	Lys	Val
	50					55					60				

Gln	Val	Lys	Ile	Gln	Asn	Pro	Thr	Ala	Cys	Thr	Ala	Asn	Gly	Ser	Cys
65					70					75					80

Asp	Pro	Ser	Val	Thr	Arg	Gln	Lys	Tyr	Ala	Asp	Val	Thr	Phe	Ser	Phe
				85					90					95	

Thr	Gln	Tyr	Ser	Thr	Asp	Glu	Glu	Arg	Ala	Phe	Val	Arg	Thr	Glu	Leu
			100					105						110	

Ala	Ala	Leu	Leu	Ala	Ser	Pro	Leu	Leu	Ile	Asp	Ala	Ile	Asp	Gln	Leu
		115					120					125			

Asn Pro Ala Tyr

130

<210> 19

<211> 132

<212> PRT

<213> искусственная последовательность

<220>

<223> мутант бактериофага Q β 259

<400> 19

Ala	Arg	Leu	Glu	Thr	Val	Thr	Leu	Gly	Asn	Ile	Gly	Lys	Asp	Gly	Arg
1				5					10					15	

Gln	Thr	Leu	Val	Leu	Asn	Pro	Arg	Gly	Val	Asn	Pro	Thr	Asn	Gly	Val
			20					25					30		

Ala	Ser	Leu	Ser	Gln	Ala	Gly	Ala	Val	Pro	Ala	Leu	Glu	Lys	Arg	Val
		35					40						45		

Thr	Val	Ser	Val	Ser	Gln	Pro	Ser	Arg	Asn	Arg	Lys	Asn	Tyr	Lys	Val
	50					55					60				

Gln	Val	Lys	Ile	Gln	Asn	Pro	Thr	Ala	Cys	Thr	Ala	Asn	Gly	Ser	Cys
65					70					75				80	

Asp	Pro	Ser	Val	Thr	Arg	Gln	Lys	Tyr	Ala	Asp	Val	Thr	Phe	Ser	Phe
					85				90					95	

Thr	Gln	Tyr	Ser	Thr	Asp	Glu	Glu	Arg	Ala	Phe	Val	Arg	Thr	Glu	Leu
			100					105					110		

Ala	Ala	Leu	Leu	Ala	Ser	Pro	Leu	Leu	Ile	Asp	Ala	Ile	Asp	Gln	Leu
		115					120					125			

Asn Pro Ala Tyr

130

<210> 20

<211> 185

<212> PRT

<213> вирус гепатита В

<400> 20

Met	Asp	Ile	Asp	Pro	Tyr	Lys	Glu	Phe	Gly	Ala	Thr	Val	Glu	Leu	Leu
1				5					10					15	

Ser	Phe	Leu	Pro	Ser	Asp	Phe	Phe	Pro	Ser	Val	Arg	Asp	Leu	Leu	Asp
			20					25					30		

Thr	Ala	Ser	Ala	Leu	Tyr	Arg	Glu	Ala	Leu	Glu	Ser	Pro	Glu	His	Cys
	35						40					45			

Ser	Pro	His	His	Thr	Ala	Leu	Arg	Gln	Ala	Ile	Leu	Cys	Trp	Gly	Glu
	50					55					60				

Leu	Met	Thr	Leu	Ala	Thr	Trp	Val	Gly	Asn	Asn	Leu	Glu	Asp	Pro	Ala
65					70					75					80

Ser	Arg	Asp	Leu	Val	Val	Asn	Tyr	Val	Asn	Thr	Asn	Met	Gly	Leu	Lys
				85					90					95	

Ile	Arg	Gln	Leu	Leu	Trp	Phe	His	Ile	Ser	Cys	Leu	Thr	Phe	Gly	Arg
			100					105					110		

Glu	Thr	Val	Leu	Glu	Tyr	Leu	Val	Ser	Phe	Gly	Val	Trp	Ile	Arg	Thr
		115					120					125			

Pro	Pro	Ala	Tyr	Arg	Pro	Pro	Asn	Ala	Pro	Ile	Leu	Ser	Thr	Leu	Pro
	130					135					140				

Glu Thr Thr Val Val Arg Arg Arg Asp Arg Gly Arg Ser Pro Arg Arg
145 150 155 160

Arg Thr Pro Ser Pro Arg Arg Arg Arg Ser Gln Ser Pro Arg Arg Arg
165 170 175

Arg Ser Gln Ser Arg Glu Ser Gln Cys
180 185

<210> 21
<211> 188
<212> PRT
<213> вирус гепатита В

<400> 21

Met Asp Ile Asp Pro Tyr Lys Glu Phe Gly Ala Thr Val Glu Leu Leu
1 5 10 15

Ser Phe Leu Pro Ser Asp Phe Phe Pro Ser Val Arg Asp Leu Leu Asp
20 25 30

Thr Ala Ala Ala Leu Tyr Arg Asp Ala Leu Glu Ser Pro Glu His Cys
35 40 45

Ser Pro His His Thr Ala Leu Arg Gln Ala Ile Leu Cys Trp Gly Asp
50 55 60

Leu Met Thr Leu Ala Thr Trp Val Gly Thr Asn Leu Glu Asp Gly Gly
65 70 75 80

Lys Gly Gly Ser Arg Asp Leu Val Val Ser Tyr Val Asn Thr Asn Val
85 90 95

Gly Leu Lys Phe Arg Gln Leu Leu Trp Phe His Ile Ser Cys Leu Thr
100 105 110

Phe Gly Arg Glu Thr Val Leu Glu Tyr Leu Val Ser Phe Gly Val Trp
115 120 125

Ile Arg Thr Pro Pro Ala Tyr Arg Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ser
130 135 140

Thr Leu Pro Glu Thr Thr Val Val Arg Arg Arg Asp Arg Gly Arg Ser
145 150 155 160

Pro Arg Arg Arg Thr Pro Ser Pro Arg Arg Arg Arg Ser Gln Ser Pro
165 170 175

Arg Arg Arg Arg Ser Gln Ser Arg Glu Ser Gln Cys
180 185

<210> 22
<211> 70
<212> PRT
<213> Felis domesticus

<400> 22

Glu Ile Cys Pro Ala Val Lys Arg Asp Val Asp Leu Phe Leu Thr Gly
1 5 10 15

Thr Pro Asp Glu Tyr Val Glu Gln Val Ala Gln Tyr Lys Ala Leu Pro
20 25 30

Val Val Leu Glu Asn Ala Arg Ile Leu Lys Asn Cys Val Asp Ala Lys
35 40 45

Met Thr Glu Glu Asp Lys Glu Asn Ala Leu Ser Leu Leu Asp Lys Ile
50 55 60

Tyr Thr Ser Pro Leu Cys
65 70

<210> 23
 <211> 92
 <212> PRT
 <213> Felis domesticus

<400> 23

Val Lys Met Ala Glu Thr Cys Pro Ile Phe Tyr Asp Val Phe Phe Ala
 1 5 10 15

Val Ala Asn Gly Asn Glu Leu Leu Leu Asp Leu Ser Leu Thr Lys Val
 20 25 30

Asn Ala Thr Glu Pro Glu Arg Thr Ala Met Lys Lys Ile Gln Asp Cys
 35 40 45

Tyr Val Glu Asn Gly Leu Ile Ser Arg Val Leu Asp Gly Leu Val Met
 50 55 60

Thr Thr Ile Ser Ser Ser Lys Asp Cys Met Gly Glu Ala Val Gln Asn
 65 70 75 80

Thr Val Glu Asp Leu Lys Leu Asn Thr Leu Gly Arg
 85 90

<210> 24
 <211> 162
 <212> PRT
 <213> искусственная последовательность

<220>
 <223> слияние цепь 2 + цепь 1

<400> 24

Val Lys Met Ala Glu Thr Cys Pro Ile Phe Tyr Asp Val Phe Phe Ala
 1 5 10 15

Val Ala Asn Gly Asn Glu Leu Leu Leu Asp Leu Ser Leu Thr Lys Val

20

25

30

Asn Ala Thr Glu Pro Glu Arg Thr Ala Met Lys Lys Ile Gln Asp Cys
35 40 45

Tyr Val Glu Asn Gly Leu Ile Ser Arg Val Leu Asp Gly Leu Val Met
50 55 60

Thr Thr Ile Ser Ser Ser Lys Asp Cys Met Gly Glu Ala Val Gln Asn
65 70 75 80

Thr Val Glu Asp Leu Lys Leu Asn Thr Leu Gly Arg Glu Ile Cys Pro
85 90 95

Ala Val Lys Arg Asp Val Asp Leu Phe Leu Thr Gly Thr Pro Asp Glu
100 105 110

Tyr Val Glu Gln Val Ala Gln Tyr Lys Ala Leu Pro Val Val Leu Glu
115 120 125

Asn Ala Arg Ile Leu Lys Asn Cys Val Asp Ala Lys Met Thr Glu Glu
130 135 140

Asp Lys Glu Asn Ala Leu Ser Leu Leu Asp Lys Ile Tyr Thr Ser Pro
145 150 155 160

Leu Cys

<210> 25

<211> 90

<212> PRT

<213> Felis domesticus

<400> 25

Val Lys Met Ala Glu Thr Cys Pro Ile Phe Tyr Asp Val Phe Phe Ala

```

1              5              10              15

Val Ala Asn Gly Asn Glu Leu Leu Leu Asp Leu Ser Leu Thr Lys Val
      20              25              30

Asn Ala Thr Glu Pro Glu Arg Thr Ala Met Lys Lys Ile Gln Asp Cys
      35              40              45

Tyr Val Glu Asn Gly Leu Ile Ser Arg Val Leu Asp Gly Leu Val Met
      50              55              60

Ile Ala Ile Asn Glu Tyr Cys Met Gly Glu Ala Val Gln Asn Thr Val
      65              70              75              80

Glu Asp Leu Lys Leu Asn Thr Leu Gly Arg
      85              90

<210>  26
<211>  78
<212>  PRT
<213>  Felis domesticus

<400>  26

Val Lys Met Ala Glu Thr Cys Pro Ile Phe Tyr Asp Val Phe Phe Ala
1              5              10              15

Val Ala Asn Gly Asn Glu Leu Leu Leu Asp Leu Ser Leu Thr Lys Val
      20              25              30

Asn Ala Thr Glu Pro Glu Arg Thr Ala Met Lys Lys Ile Gln Asp Cys
      35              40              45

Tyr Val Glu Asn Gly Leu Ile Ser Arg Val Leu Asp Gly Leu Val Met
      50              55              60

Pro Ser Thr Asn Ile Ala Trp Val Lys Gln Phe Arg Thr Pro

```

65

70

75

<210> 27

<211> 27

<212> PRT

<213> Felis domesticus

<400> 27

Lys	Arg	Asp	Val	Asp	Leu	Phe	Leu	Thr	Gly	Thr	Pro	Asp	Glu	Tyr	Val
1				5					10					15	

Glu	Gln	Val	Ala	Gln	Tyr	Lys	Ala	Leu	Pro	Val
			20					25		

<210> 28

<211> 27

<212> PRT

<213> Felis domesticus

<400> 28

Lys	Ala	Leu	Pro	Val	Val	Leu	Glu	Asn	Ala	Arg	Ile	Leu	Lys	Asn	Cys
1				5					10					15	

Val	Asp	Ala	Lys	Met	Thr	Glu	Glu	Asp	Lys	Glu
			20					25		

<210> 29

<211> 26

<212> PRT

<213> Felis domesticus

<400> 29

Phe	Phe	Ala	Val	Ala	Asn	Gly	Asn	Glu	Leu	Leu	Leu	Asp	Leu	Ser	Leu
1				5					10					15	

Thr	Lys	Val	Asn	Ala	Thr	Glu	Pro	Glu	Arg
			20					25	

<210> 30
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Felis domesticus

<400> 30

Glu Glu Asp Lys Glu Asn Ala Leu Ser Leu Leu Asp Lys Ile Tyr Thr
 1 5 10 15

Ser Pro Leu

<210> 31
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Felis domesticus

<400> 31

Met Gly Glu Ala Val Gln Asn Thr Val Glu Asp Leu Lys Leu Asn Thr
 1 5 10 15

Leu Gly Arg

<210> 32
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Felis domesticus

<400> 32

Glu Glu Asp Lys Glu Asn Ala Leu Ser Leu Leu Asp Lys Ile Tyr Thr
 1 5 10 15

<210> 33
 <211> 174
 <212> PRT
 <213> искусственная последовательность

<220>

<223> слияние с his tag и GGC

<400> 33

Met	Val	Lys	Met	Ala	Glu	Thr	Cys	Pro	Ile	Phe	Tyr	Asp	Val	Phe	Phe
1				5					10					15	

Ala	Val	Ala	Asn	Gly	Asn	Glu	Leu	Leu	Leu	Asp	Leu	Ser	Leu	Thr	Lys
			20					25					30		

Val	Asn	Ala	Thr	Glu	Pro	Glu	Arg	Thr	Ala	Met	Lys	Lys	Ile	Gln	Asp
	35						40					45			

Cys	Tyr	Val	Glu	Asn	Gly	Leu	Ile	Ser	Arg	Val	Leu	Asp	Gly	Leu	Val
	50					55					60				

Met	Thr	Thr	Ile	Ser	Ser	Ser	Lys	Asp	Cys	Met	Gly	Glu	Ala	Val	Gln
65					70				75						80

Asn	Thr	Val	Glu	Asp	Leu	Lys	Leu	Asn	Thr	Leu	Gly	Arg	Glu	Ile	Cys
			85					90						95	

Pro	Ala	Val	Lys	Arg	Asp	Val	Asp	Leu	Phe	Leu	Thr	Gly	Thr	Pro	Asp
			100					105						110	

Glu	Tyr	Val	Glu	Gln	Val	Ala	Gln	Tyr	Lys	Ala	Leu	Pro	Val	Val	Leu
		115					120					125			

Glu	Asn	Ala	Arg	Ile	Leu	Lys	Asn	Cys	Val	Asp	Ala	Lys	Met	Thr	Glu
	130					135					140				

Glu	Asp	Lys	Glu	Asn	Ala	Leu	Ser	Leu	Leu	Asp	Lys	Ile	Tyr	Thr	Ser
145					150					155					160

Pro	Leu	Cys	Leu	Glu	His	His	His	His	His	His	Gly	Gly	Cys		
				165						170					

<210> 34
 <211> 85
 <212> ДНК
 <213> искусственная последовательность

<220>
 <223> праймер 1F

<400> 34
 gtacatatgg aaatctgccc ggctgttaaa cgtgacgttg acctgttcct gaccgggtacc 60
 ccggacgaat acgttgaaca ggttg 85

<210> 35
 <211> 38
 <212> ДНК
 <213> искусственная последовательность

<220>
 <223> праймер 2R

<400> 35
 ggcagagctt tgtactgagc aacctgttca acgtattc 38

<210> 36
 <211> 75
 <212> ДНК
 <213> искусственная последовательность

<220>
 <223> праймер 3F

<400> 36
 gctcagtaca aagctctgcc gggtgttctg gaaaacgctc gtatcctgaa aaactgcgtt 60
 gacgctaaaa tgacc 75

<210> 37
 <211> 89
 <212> ДНК
 <213> искусственная последовательность

<220>

<223> праймер 4R

<400> 37

cctctcgagg cacagcgggg aggtgtagat tttgtccagc agggacagag cgttttcttt 60

gtcttcttcg gtcatttttag cgtcaacgc 89

<210> 38

<211> 76

<212> ДНК

<213> искусственная последовательность

<220>

<223> праймер 5F

<400> 38

gtacatatgg ttaaaatggc tgaaacctgc ccgatcttct acgacgtttt cttecgctgtt 60

gctaacggta асгаас 76

<210> 39

<211> 75

<212> ДНК

<213> искусственная последовательность

<220>

<223> праймер 6R

<400> 39

ggtagcttcc ggttcggtag cgttaacttt ggtcagggac aggtccagca gcagttcggtt 60

accgttagca асagc 75

<210> 40

<211> 80

<212> ДНК

<213> искусственная последовательность

<220>

<223> праймер 7F

<400> 40

ctaccgaacc ggaacgtacc gctatgaaaa aaatccagga ctgctacgtt gaaaacggtc 60

tgatctcccg tgttctggac

80

<210> 41

<211> 71

<212> ДНК

<213> искусственная последовательность

<220>

<223> праймер 8R

<400> 41

gcttcaccca tgcagtcctt ggaggaggag atgggtgggtca taaccagacc gtccagaaca 60

cgggagatca g

71

<210> 42

<211> 75

<212> ДНК

<213> искусственная последовательность

<220>

<223> праймер 9F

<400> 42

caaagactgc atgggtgaag ctgttcagaa caccgttgaa gacctgaaac tgaacaccct 60

gggtcgctcg agagg

75

<210> 43

<211> 21

<212> ДНК

<213> искусственная последовательность

<220>

<223> праймер 10R

<400> 43

cctctcgagc gacccagggg g

21

<210> 44

<211> 45

<212> ДНК

<213> искусственная последовательность

<220>

<223> праймерный линкер

<400> 44

cgtttaacag ccgggcagat ttcacgaccc aggggtgttca gtttc

45

<210> 45

<211> 28

<212> ДНК

<213> искусственная последовательность

<220>

<223> праймер 12-1

<400> 45

gtacatatgg aaatctgccc ggctgtta

28

<210> 46

<211> 48

<212> ДНК

<213> искусственная последовательность

<220>

<223> праймер 12-3

<400> 46

gcagggtttca gccattttaa cgcacagcgg ggagggtgtag attttgtc

48

<210> 47

<211> 39

<212> ДНК

<213> искусственная последовательность

<220>

<223> праймер 12-2-1

<400> 47

cctctcgaga cgaccacaggg tgttcagttt cagggtcttc

39

<210> 48

<211> 58

<212> ДНК

<213> искусственная последовательность

<220>

<223> праймер 1-10aa

<400> 48

ggtggaggag gtagcgggtgg aggaggtagc gaaatctgcc cggctgttaa acgtgacg 58

<210> 49

<211> 41

<212> ДНК

<213> искусственная последовательность

<220>

<223> праймер 2-5aa

<400> 49

gctacctcct ccaccacgac ccagggtggt cagtttcagg t 41

<210> 50

<211> 43

<212> ДНК

<213> искусственная последовательность

<220>

<223> праймер 1-5aa

<400> 50

ggtggaggag gtagcgaaat ctgcccggt gttaaactg acg 43

<210> 51

<211> 59

<212> ДНК

<213> искусственная последовательность

<220>

<223> праймер 2-10aa

<400> 51

ggtggaggag gtagcgggtgg aggaggtagc gttaaatgg ctgaaacctg cccgatctt 59

<210> 52

<211> 42
 <212> ДНК
 <213> искусственная последовательность

<220>
 <223> праймер 1-5aa

<400> 52
 gctacctcct ccaccgcaca gcggggaggt gtagattttg tc 42

<210> 53
 <211> 44
 <212> ДНК
 <213> искусственная последовательность

<220>
 <223> праймер 2-5aa

<400> 53
 ggtggaggag gtagcgtaa aatggctgaa acctgcccga tctt 44

<210> 54
 <211> 175
 <212> PRT
 <213> искусственная последовательность

<220>
 <223> FELD1-10aa

<400> 54

Met	Val	Lys	Met	Ala	Glu	Thr	Cys	Pro	Ile	Phe	Tyr	Asp	Val	Phe	Phe
1				5					10					15	

Ala	Val	Ala	Asn	Gly	Asn	Glu	Leu	Leu	Leu	Asp	Leu	Ser	Leu	Thr	Lys
			20					25					30		

Val	Asn	Ala	Thr	Glu	Pro	Glu	Arg	Thr	Ala	Met	Lys	Lys	Ile	Gln	Asp
		35					40					45			

Cys	Tyr	Val	Glu	Asn	Gly	Leu	Ile	Ser	Arg	Val	Leu	Asp	Gly	Leu	Val
	50					55					60				

Met Thr Thr Ile Ser Ser Ser Lys Asp Cys Met Gly Glu Ala Val Gln
65 70 75 80

Asn Thr Val Glu Asp Leu Lys Leu Asn Thr Leu Gly Arg Gly Gly Gly
85 90 95

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ile Cys Pro Ala Val Lys Arg Asp
100 105 110

Val Asp Leu Phe Leu Thr Gly Thr Pro Asp Glu Tyr Val Glu Gln Val
115 120 125

Ala Gln Tyr Lys Ala Leu Pro Val Val Leu Glu Asn Ala Arg Ile Leu
130 135 140

Lys Asn Cys Val Asp Ala Lys Met Thr Glu Glu Asp Lys Glu Asn Ala
145 150 155 160

Leu Ser Leu Leu Asp Lys Ile Tyr Thr Ser Pro Leu Cys Leu Glu
165 170 175

<210> 55

<211> 180

<212> PRT

<213> искусственная последовательность

<220>

<223> FELD1-15aa

<400> 55

Met Val Lys Met Ala Glu Thr Cys Pro Ile Phe Tyr Asp Val Phe Phe
1 5 10 15

Ala Val Ala Asn Gly Asn Glu Leu Leu Leu Asp Leu Ser Leu Thr Lys
20 25 30

Val Asn Ala Thr Glu Pro Glu Arg Thr Ala Met Lys Lys Ile Gln Asp
35 40 45

Cys Tyr Val Glu Asn Gly Leu Ile Ser Arg Val Leu Asp Gly Leu Val
50 55 60

Met Thr Thr Ile Ser Ser Ser Lys Asp Cys Met Gly Glu Ala Val Gln
65 70 75 80

Asn Thr Val Glu Asp Leu Lys Leu Asn Thr Leu Gly Arg Gly Gly Gly
85 90 95

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ile Cys Pro
100 105 110

Ala Val Lys Arg Asp Val Asp Leu Phe Leu Thr Gly Thr Pro Asp Glu
115 120 125

Tyr Val Glu Gln Val Ala Gln Tyr Lys Ala Leu Pro Val Val Leu Glu
130 135 140

Asn Ala Arg Ile Leu Lys Asn Cys Val Asp Ala Lys Met Thr Glu Glu
145 150 155 160

Asp Lys Glu Asn Ala Leu Ser Leu Leu Asp Lys Ile Tyr Thr Ser Pro
165 170 175

Leu Cys Leu Glu
180

<210> 56

<211> 165

<212> PRT

<213> искусственная последовательность

<220>

<223> FD12

<400> 56

Met Glu Ile Cys Pro Ala Val Lys Arg Asp Val Asp Leu Phe Leu Thr
 1 5 10 15

Gly Thr Pro Asp Glu Tyr Val Glu Gln Val Ala Gln Tyr Lys Ala Leu
 20 25 30

Pro Val Val Leu Glu Asn Ala Arg Ile Leu Lys Asn Cys Val Asp Ala
 35 40 45

Lys Met Thr Glu Glu Asp Lys Glu Asn Ala Leu Ser Leu Leu Asp Lys
 50 55 60

Ile Tyr Thr Ser Pro Leu Cys Val Lys Met Ala Glu Thr Cys Pro Ile
 65 70 75 80

Phe Tyr Asp Val Phe Phe Ala Val Ala Asn Gly Asn Glu Leu Leu Leu
 85 90 95

Asp Leu Ser Leu Thr Lys Val Asn Ala Thr Glu Pro Glu Arg Thr Ala
 100 105 110

Met Lys Lys Ile Gln Asp Cys Tyr Val Glu Asn Gly Leu Ile Ser Arg
 115 120 125

Val Leu Asp Gly Leu Val Met Thr Thr Ile Ser Ser Ser Lys Asp Cys
 130 135 140

Met Gly Glu Ala Val Gln Asn Thr Val Glu Asp Leu Lys Leu Asn Thr
 145 150 155 160

Leu Gly Arg Leu Glu
 165

<210> 57
 <211> 180
 <212> PRT
 <213> искусственная последовательность

<220>
 <223> FD12-15aa

<400> 57

Met Glu Ile Cys Pro Ala Val Lys Arg Asp Val Asp Leu Phe Leu Thr
 1 5 10 15

Gly Thr Pro Asp Glu Tyr Val Glu Gln Val Ala Gln Tyr Lys Ala Leu
 20 25 30

Pro Val Val Leu Glu Asn Ala Arg Ile Leu Lys Asn Cys Val Asp Ala
 35 40 45

Lys Met Thr Glu Glu Asp Lys Glu Asn Ala Leu Ser Leu Leu Asp Lys
 50 55 60

Ile Tyr Thr Ser Pro Leu Cys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 65 70 75 80

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Val Lys Met Ala Glu Thr Cys Pro Ile Phe
 85 90 95

Tyr Asp Val Phe Phe Ala Val Ala Asn Gly Asn Glu Leu Leu Leu Asp
 100 105 110

Leu Ser Leu Thr Lys Val Asn Ala Thr Glu Pro Glu Arg Thr Ala Met
 115 120 125

Lys Lys Ile Gln Asp Cys Tyr Val Glu Asn Gly Leu Ile Ser Arg Val
 130 135 140

Leu Asp Gly Leu Val Met Thr Thr Ile Ser Ser Ser Lys Asp Cys Met
145 150 155 160

Gly Glu Ala Val Gln Asn Thr Val Glu Asp Leu Lys Leu Asn Thr Leu
165 170 175

Gly Arg Leu Glu
180

<210> 58
<211> 10
<212> PRT
<213> искусственная последовательность

<220>
<223> линкер гамма 1

<400> 58

Cys Gly Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro
1 5 10

<210> 59
<211> 6
<212> PRT
<213> искусственная последовательность

<220>
<223> N-концевой глициновый линкер

<400> 59

Gly Cys Gly Gly Gly Gly
1 5

<210> 60
<211> 6
<212> PRT
<213> искусственная последовательность

<220>
<223> N-концевой глицин-сериновый линкер

<400> 60

Cys Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 61

<211> 9

<212> PRT

<213> искусственная последовательность

<220>

<223> линкер GCGSGGGGS

<400> 61

Gly Cys Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 62

<211> 10

<212> PRT

<213> искусственная последовательность

<220>

<223> С-концевой линкер гамма 1

<400> 62

Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Cys Gly
1 5 10

<210> 63

<211> 18

<212> PRT

<213> искусственная последовательность

<220>

<223> С-концевой линкер гамма 3

<400> 63

Pro Lys Pro Ser Thr Pro Pro Gly Ser Ser Gly Gly Ala Pro Gly Gly
1 5 10 15

Cys Gly

<210> 64
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> искусственная последовательность

<220>
 <223> С-концевой глициновый линкер

<400> 64

Gly Gly Gly Gly Cys Gly
 1 5

<210> 65
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> искусственная последовательность

<220>
 <223> С-концевой глицин-сериновый линкер

<400> 65

Ser Gly Gly Gly Gly Cys
 1 5

<210> 66
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> искусственная последовательность

<220>
 <223> линкер GSGGGGSGCG

<400> 66

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Cys Gly
 1 5 10

<210> 67
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> искусственная последовательность

<220>
 <223> глицин-лизиновый линкер

<400> 67

Gly Gly Lys Lys Gly Cys
 1 5

<210> 68
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> искусственная последовательность

<220>
 <223> глицин-лизиновый линкер 2

<400> 68

Cys Gly Lys Lys Gly Gly
 1 5

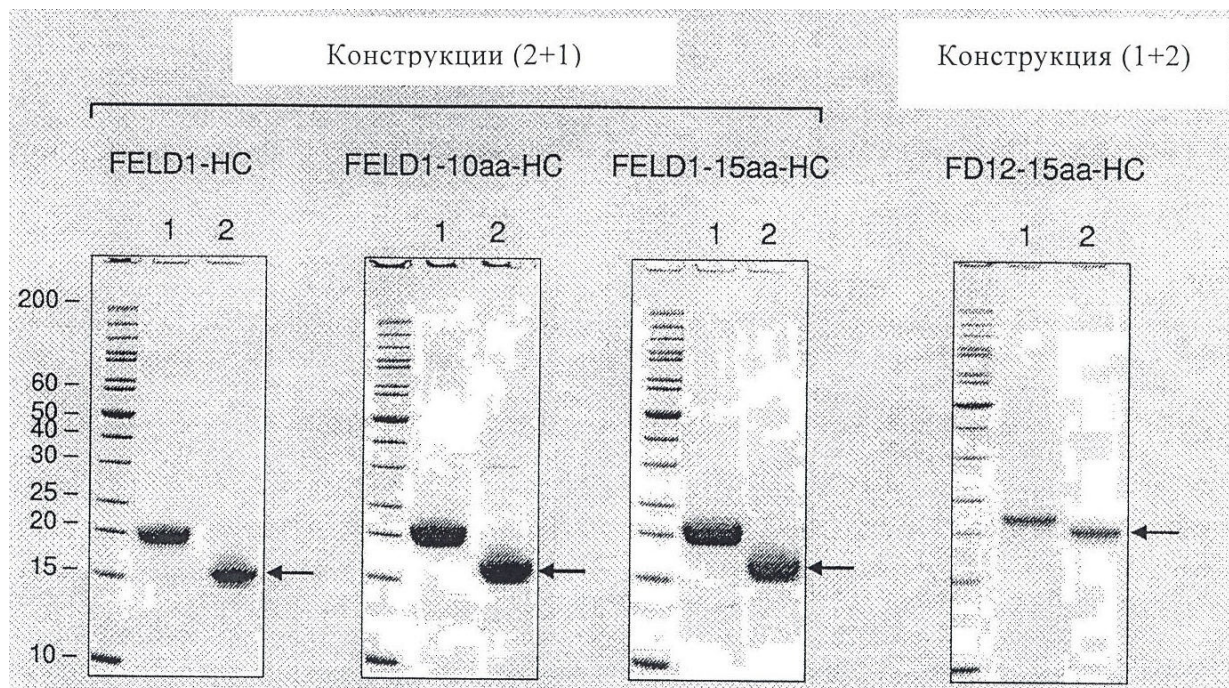
<210> 69
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> искусственная последовательность

<220>
 <223> CGGPKPSTPPGSSGGAP

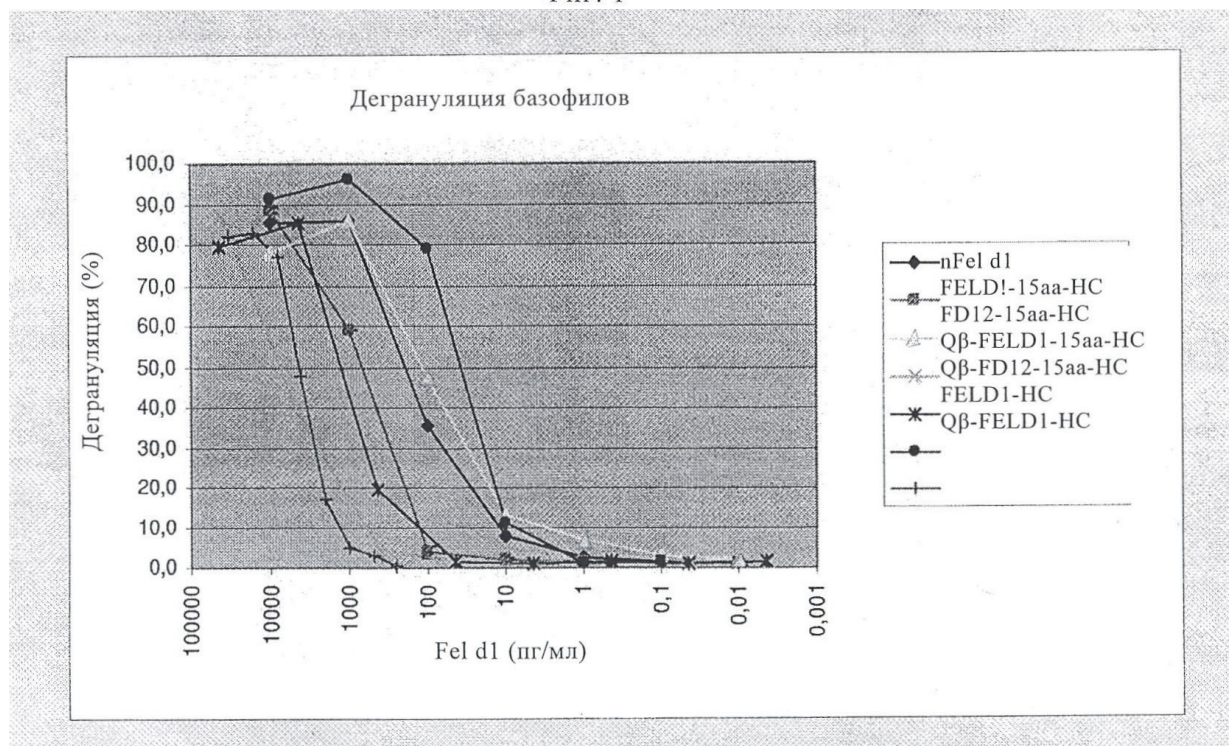
<400> 69

Cys Gly Gly Pro Lys Pro Ser Thr Pro Pro Gly Ser Ser Gly Gly Ala
 1 5 10 15

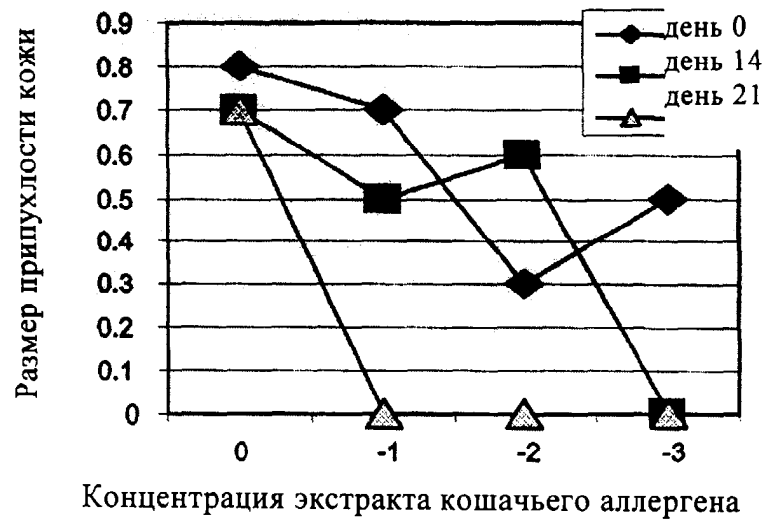
Pro



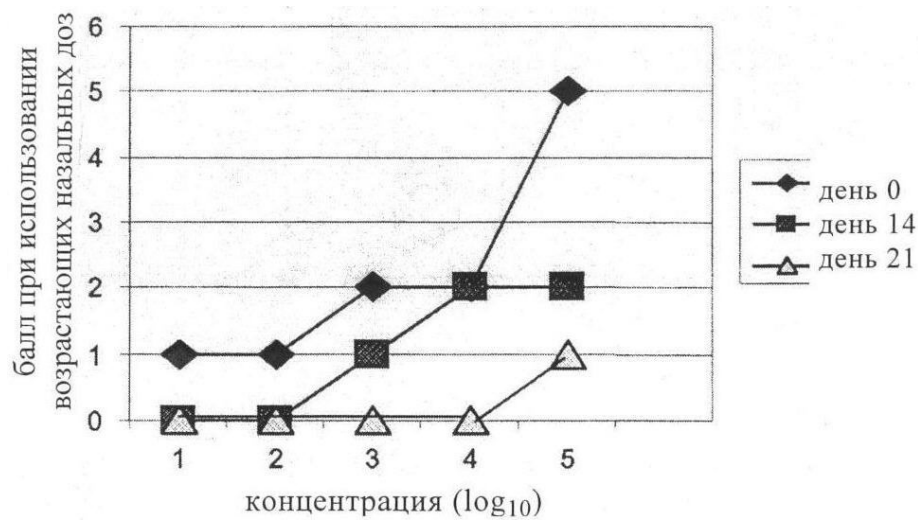
Фиг. 1



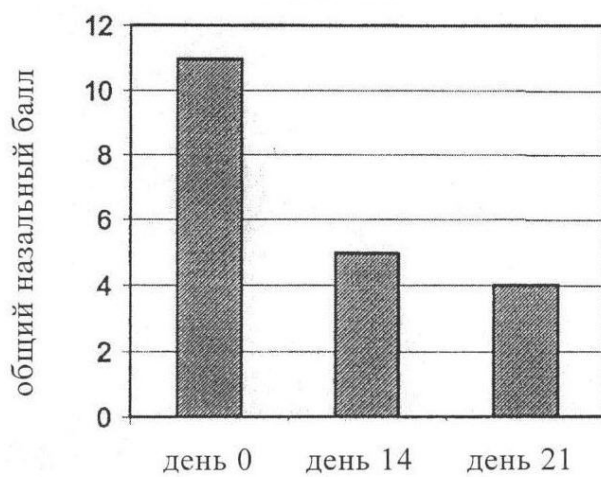
Фиг. 2



Фиг. 3



Фиг. 4А



Фиг. 4Б

Фиг. 4