

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **201391467** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2014.06.30

(51) Int. Cl. *A61K 39/00* (2006.01)
A61K 9/127 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2012.04.25

(54) **ЛИПОСОМНЫЕ КОМПОЗИЦИИ**

(31) **61/479,302**

(32) **2011.04.26**

(33) **US**

(86) **PCT/US2012/035034**

(87) **WO 2012/149045 2012.11.01**

(88) **2014.02.20**

(71) Заявитель:
МОЛЕКУЛАР ЭКСПРЕСС, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Фуджи Гари, Эрнст Уильям А., Адлер-Мур Джилл, Висиан Линда (US)

(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к липосомным вакцинным композициям, способам их производства и способам их применения для стимуляции иммунного ответа у животного. Эти композиции включают липосомы, сформированные из димристоилфосфатидилхолина (DMPC); либо димристоилфосфатидилглицерина (DMPG) или димристоилметиламмонийпропана (DMTAP), или и DMPC, и DMTAP; а также по меньшей мере одного стерина; и анигенного полипептида, содержащего первую полипептидную последовательность и вторую полипептидную последовательность, гетерологичную по отношению к первой полипептидной последовательности, которая содержит трансмембранную последовательность из мембранного белка, причем в указанной трансмембранной последовательности имеется количество остатков, достаточное для пересечения липидного бислоя, по меньшей мере девять последовательных остатков из которых по прогнозу образуют α -спираль с показателем гидрофобности приблизительно 0,7 или выше.

201391467
A1

201391467
A1

ЛИПОСОМНЫЕ КОМПОЗИЦИИ

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] Настоящее изобретение испрашивает приоритет на основании Предварительной патентной заявки США № 61/479302, поданной 26 апреля 2011 года, которая включена в настоящую заявку во всей полноте, включая все таблицы, фигуры и пункты формулы изобретения.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

ЗАЯВЛЕНИЕ О ФЕДЕРАЛЬНОМ СПОНСИРОВАНИИ ИССЛЕДОВАНИЯ

[0002] Правительство США имеет оплаченную лицензию на это изобретение и право, в ограниченных случаях, требовать у владельца патента лицензировать другие лица по приемлемым условиям, в соответствии с условиями грантов Национального института аллергических и инфекционных заболеваний (НИИ) №№ U01AI074508 и 1R43AI078654.

[0003] Нижеизложенное описание уровня техники изобретения представлено только для того, чтобы помочь читателю в понимании изобретения, и не предполагается, что оно описывает или составляет известный уровень техники настоящего изобретения.

[0004] Липосомы являются пузырьками, образованными из одного («однослойные») или более («многослойные») слоев фосфолипидов. По причине амфипатического характера фосфолипидных составляющих блоков, липосомы обычно содержат гидрофильный слой, у которого снаружи находится гидрофильная внешняя поверхность, а внутри заключено гидрофильное ядро. Адаптивность липосом при захвате гидрофильных/гидрофобных компонентов, их нетоксическая природа, биоразлагаемость, биосовместимость, адьювантность, индукция клеточного иммунитета, способность к поддержанию длительного высвобождения и быстрого захвата макрофагами делают их перспективными кандидатами для доставки антигенов.

[0005] Было показано, что липосомы индуцируют и гуморальный, и клеточно-опосредованный иммунитет к большому количеству антигенов бактерий, простейших, вирусов и опухолевых клеток. Хотя в течение долгого периода времени ожидалось широкое использование липосомных вакцин, до уровня промышленного производства было разработано лишь небольшое количество таких вакцин. Иммуноадьювантное действие липосом зависит от различных структурных характеристик. Такие характеристики включают трехмерную конформацию антигена, презентуемого липосомой, которая не всегда может имитировать естественную конформацию антигена.

[0006] К примеру, мембранно-проксимальный регион (MPR) ВИЧ gp41, который представляет собой сегмент, содержащий приблизительно 35 аминокислот с N-конца

трансмембранного домена, рассматривался как желательная мишень для вакцины, поскольку он высококонсервативен у различных клад вируса и необходим для проникновения вируса в клетку. Однако до настоящего времени не было достигнуто успеха в формировании полезного иммунного ответа, и попытки презентировать структурно ограниченные эпитопы, или конъюгированные с белками-носителями, или привитые на рекомбинантные конструкции, не приводили к образованию нейтрализующих антител. Помимо отсутствия согласия о структуре эпитопа, относительно слабая иммуногенность MPR может приводить к формированию иммунных ответов на рекомбинантные оболочечные иммуногены против иммунодоминантных областей gp41, которые ограждают MPR от распознавания антителами.

[0007] Помимо этого, по способам, в которых связывание антигена с липосомой происходит до образования липосомы, антиген часто подвергается воздействию поверхностно-активными веществами и/или органическими растворителями. Наоборот, по способам, в которых происходит связывание антигена с липосомой после ее образования, липосома может подвергаться нежелательной химической обработке. Липосомы могут также быть быстро удалены ретикулоэндотелиальной системой и макрофагами, что снижает эффективность липосомы в качестве вакцины.

[0008] Помимо этого, такие характеристики могут также включать факторы, которые контролируют судьбу пузырька *in vivo*. По способам, в которых связывание антигена с липосомой происходит до образования липосомы, антиген часто подвергается воздействию поверхностно-активными веществами и/или органическими растворителями. Наоборот, по способам, в которых происходит связывание антигена с липосомой после ее образования, липосома может подвергаться нежелательной химической обработке. Липосомы могут быть быстро удалены ретикулоэндотелиальной системой и макрофагами, что снижает эффективность липосомы в качестве вакцины.

[0009] В области техники имеется необходимость в способах и композициях, по которым могут быть получены липосомные вакцины, доставляющие антигены путем, полезным для стимулирования иммунного ответа.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0010] Объектом изобретения является предоставление липосомных композиций, способов их производства и способов их использования. Такие композиции могут использоваться как вакцинальные составы для стимуляции иммунного ответа у животного.

[0011] В одном аспекте, изобретение относится к композиции, содержащей:

- а) водный носитель; и
- б) липосомы, содержащие:
 - (i) димиристоилфосфатидилхолин («DMPC»),
 - (ii) димиристоилфосфатидилглицерин («DMPG»), димиристоилтриметиламмоний-пропан («DMTAP»), либо DMPG и DMTAP вместе,
 - (iii) по меньшей мере один стерин; и
 - iv) антигенную полипептидную последовательность, а также вторую полипептидную последовательность, содержащую трансмембранную последовательность природного гетерологичного мембранного белка, либо происходящую от него, причем в указанной второй полипептидной последовательности имеется количество остатков, достаточное для пересечения липидного бислоя, по меньшей мере девять последовательных остатков из которых по прогнозу образуют альфа-спираль с показателем гидрофобности приблизительно 0,7 или выше, в которой указанная антигенная полипептидная последовательность прямо или опосредованно связана с N- или C- концом указанной второй полипептидной последовательности с получением водорастворимого слитого белка, и в которой антигенная полипептидная последовательность слитого белка представлена на внешней поверхности липосом.

[0012] В этом контексте термин «приблизительно» обозначает +/- 10% от заданного значения.

[0013] Для целей изобретения альфа-спиральность и гидрофобность полипептидной последовательности рассчитывается по методологии Eisenberg et al., J. Mol. Biol. (1984) 179:125-142, с использованием следующих параметров: размер окна 9, относительный вес краев 100%, линейная вариация веса, и со следующими аминокислотными масштабными факторами:

Ала: 0,620 Арг: -2,530 Асн: -0,780 Асп: -0,900 Цис: 0,290 Глн: -0,850 Глу: -0,740 Гли: 0,480 Гис: -0,400 Иле: 1,380 Лей: 1,060 Лиз: -1,500 Мет: 0,640 Фен: 1,190 Про: 0,120 Сер: -0,180 Тре: -0,050 Трп: 0,810 Тир: 0,260 Вал: 1,080.

[0014] Как отмечается, подходящие гидрофобные последовательности обычно обладают длиной, достаточной для пересечения липидного бислоя (начиная от приблизительно 15-30 остатков; более предпочтительно, начиная от приблизительно 18-25 остатков), по меньшей мере девять последовательных остатков из которых по прогнозу образуют альфа-спираль с гидрофобностью (показатель Эйзенберга) приблизительно +0,7.

[0015] В определенных вариантах воплощения вышеизложенного изобретение относится к композиции, содержащей:

- а) водный носитель; и
- б) липосомы, содержащие:
 - (i) димиристоилфосфатидилхолин («DMPC»),
 - (ii) димиристоилфосфатидилглицерин («DMPG»), димиристоилтриметиламмоний-пропан («DMTAP»), либо DMPG и DMTAP вместе,
 - (iii) по меньшей мере один стерин; и
 - iv) антигенный полипептид, содержащий первую полипептидную последовательность, содержащую по меньшей мере 10 последовательных остатков внеклеточного домена M2, последовательность которого была модифицирована так, чтобы удалить один или более остатков цистеина, естественным образом встречающихся в указанном внеклеточном домене M2, и вторую полипептидную последовательность, содержащую трансмембранную последовательность природного гетерологичного мембранного белка, либо происходящую от него, причем в указанной второй полипептидной последовательности имеется количество остатков, достаточное для пересечения липидного бислоя, по меньшей мере девять последовательных остатков из которых по прогнозу образуют альфа-спираль с показателем гидрофобности приблизительно 0,7 или выше, в которой указанная антигенная полипептидная последовательность прямо или опосредованно связана с N- или C- концом указанной второй полипептидной последовательности с получением водорастворимого слитого белка, и в которой антигенная полипептидная последовательность слитого белка представлена на внешней поверхности липосом.

[0016] Термин «внеклеточный домен M2» при использовании здесь обозначает полипептид, производный от белка IAV M2, содержащего по меньшей мере 10 аминокислотных остатков внеклеточного домена нативной или консенсусной последовательности белка M2, и в которой отсутствует весь или часть трансмембранного домена белка M2, при помощи чего итоговый полипептид внеклеточного домена M2 растворим в водной среде.

[0017] Примеры нативных последовательностей белка IAV M2 включают:

Swiss-Prot Q0A2E4 (SEQ ID NO: 1):

```

      10          20          30          40          50          60
MSLLTEVETP TRNGWECKCS DSSDPLVIAA SIIGILHLIL CILDRLFFKC IYRRLKYGLK

      70          80          90
RGPSTEGVPE SMREEYRQEQ QSAVDVDDGH FVNIELE

```

Swiss-Prot P63231 (SEQ ID NO: 2):

10 20 30 40 50 60
MSLLTEVETP IRNEWGCR CN DSSDPLVVAA SIIGILHLIL WILDRLFFKC IYRFFEHLK
70 80 90
RGPSTEGVPE SMREEYRKEQ QSAVDADDSH FVSIELE

Swiss-Prot P06821 (SEQ ID NO: 3):

10 20 30 40 50 60
MSLLTEVETP IRNEWGCR CN GSSDPLAIAA NIIGILHLIL WILDRLFFKC IYRRFKYGLK
70 80 90
GGPSTEGVPK SMREEYRKEQ QSAVDADDGH FVSIELE

Swiss-Prot P05780 (SEQ ID NO: 4):

10 20 30 40 50 60
MSLLTEVETP IRNEWGCR CN DSSDPLVIAA NIIGILHLIL WILDRLFFKC IYRRFKYGLK
70 80 90
RGPSTEGVPE SMREEYRKEQ QNAVDVDDGH FVNIELE

Swiss-Prot P35938 (SEQ ID NO: 5):

10 20 30 40 50 60
MSLLTEVETP IRNEWGCR CN DSSDPLVVAA SIIGILHLIL WILDRLFFKC IYRLFKHGLK
70 80 90
RGPSTEGVPE SMREEYRKEQ QNAVDADDSH FVNIELE

Swiss-Prot P05778 (SEQ ID NO: 6):

10 20 30 40 50 60
MSLLTEVETP TRNGWECSCS DSSDPLVIAA SIIGILHFIL WILDRLFFKC IYRRLKYGLK
70 80 90
RGPSTEGVPK SMREEYRQEQ QNAVDVDDGH FVNIELE

Swiss-Prot P03492 (SEQ ID NO: 7):

10 20 30 40 50 60
MSLLTEVETP TRNGWECR CN DSSDPLIIAA SIIGILHLIL WILNRLFFKC IYRRLKYGLK

70 80 90
 RGPSTEGVPE SMREEYRQEQ QSAVDVDDGH FVNIELE

Swiss-Prot O70632 (SEQ ID NO: 8):

10 20 30 40 50 60
 MSLLTEVETL TRNGWGCRC S DSSDPLVVA SIIGILHLIL WILDRLFFKC IYRRFKYGLK

70 80 90
 RGPSTEGVPE SMREEYRQEQ QNAVDVDDGH FVNIELE

Swiss-Prot P63232 (SEQ ID NO: 9):

10 20 30 40 50 60
 MSLLTEVETP IRNEWGCRCN DSSDPLVVA SIIGILHLIL WILDRLFFKC IYRFFEHGLK

70 80 90
 RGPSTEGVPE SMREEYRKEQ QSAVDADDSH FVSIELE

Не предполагается, что этот перечень исчерпывающий, поскольку были секвенированы сотни изолятов IAV с выводом последовательности белка M2. В этих последовательностях остатки 2 – 22 представляют собой внеклеточный домен (начальный метионин обычно удален); остатки 23 – 43 представляют собой трансмембранный домен; а остатки 44 – 97 представляют собой цитоплазматический домен.

[0018] Консенсусные внеклеточные доменные последовательности IAV M2 были определены по корреляции во множестве изолятов IAV. Три консенсусные последовательности для вирусных изолятов, происходящих от разных видов, были описаны в Betakova, *Current Pharmaceutical Design*, 2007, 13, 3231-3235:

Человек (SEQ ID NO: 10): SLLTEVETPIRNEWGCRCNDSSD

Свинья (SEQ ID NO: 11): SLLTEVETPIRNGWECKCNDSSD

Птицы (SEQ ID NO: 12): SLLTEVETPTRNGWECKCSDSSD

[0019] В определенных вариантах воплощения из этих последовательностей удалены остатки цистеина. Это может быть выполнено мутированием остатков цистеина в другой остаток (например, серин), либо обрезанием внеклеточного домена перед остатками цистеина. В предпочтительных вариантах воплощения последовательности внеклеточного домена IAV M2, которые используются в антигенных полипептидах, описанных здесь, содержат по меньшей мере 10 последовательных остатков, а наиболее предпочтительно — все 15 остатков из одной или более следующих последовательностей:

Человек (SEQ ID NO: 13): SLLTEVETPIRNEWG;

Свинья (SEQ ID NO: 14): SLLTEVETPIRNGWE; или

Птицы (SEQ ID NO: 15): SLLTEVETPTRNGWE

[0020] В одном примере такой предпочтительной последовательности внеклеточного домена IAV M2, в которой цистеины были мутированы в серин, последовательность внеклеточного домена IAV M2, используемого в антигенных полипептидах, описанных здесь, содержит:

(SEQ ID NO: 16): SLLTEVETPIRNEWGSRSDSSD

[0021] Примеры антигенных полипептидных последовательностей HSV2 включают, не ограничиваясь перечисленными, следующие (SEQ ID NOS: 60-81):

Наименование белка (остатки)	(наименование гена)	Последовательность
Подавленный покровный белок хозяина (261-270)	(UL41)	HTDLHPNNTY
Покровный белок VP13/14 (363-371)	(UL47)	RSSLGSLLY
Субъединица 1 рибонуклеотидредуктазы (517-525)	(UL39)	YMESVFQMY
Покровный белок VP13/14 (289-298)	(UL47)	FLVDAIVRVA
Оболочечный гликопротеин В (443-451)	(UL27)	FLIAYQPLL
Покровный белок упаковки ДНК (372-380)	(UL25)	FLWEDQTL
Субъединица 2 рибонуклеотидредуктазы 2(181-89)	(UL40)	ILIEGFFA
Субъединица 1 рибонуклеотидредуктазы 1(430-438)	(UL39)	RILGVLVHL
Оболочечный гликопротеин В (275-283)	(UL27)	SVYPYDEFV
Пластинчатый белок поры ядра (291-299)	(UL31)	EYQRLYATF
Многофункциональный регулятор экспрессии (504-512)	(UL54)	KYFYCNSLF
Регулятор транскрипции (1243-1252)	(ICP4)	LYPDAPPLRL
Покровный белок VP13/14 (363-371)	(UL47)	ALATVTLKY
Белок инфицированной клетки 8 (460-468)	(UL29)	ALLAKMLFY
Покровный белок VP11/12 (224-234)	(UL46)	LLAYVSVLY
Покровный белок VP11/12 (333-341)	(UL46)	SIVHHHAQY
Покровный белок упаковки ДНК (175-184)	(UL25)	SSGVVFGTWY
Оболочечный гликопротеин В (290-298)	(UL27)	VYMSPFYGY
Белок, связывающий одноцепочечную ДНК (895-903)	(UL29)	YMANQILRY
Протеаза созревания капсида (22-30)	(UL26)	YVAGFLALY
Оболочечный гликопротеин I (97-105)	(US7)	CPRRPAVAF
Оболочечный гликопротеин I (22-30)	(US7)	VVRGPTVSL

[0022] Для целей данного изобретения полипептидная последовательность называется «производной» от конкретной встречающейся в природе белковой последовательности, если она по меньшей мере на 90% идентична, более предпочтительно, на 95% идентична и наиболее предпочтительно, идентична по меньшей мере на 97% последовательности встречающегося в природе белка.

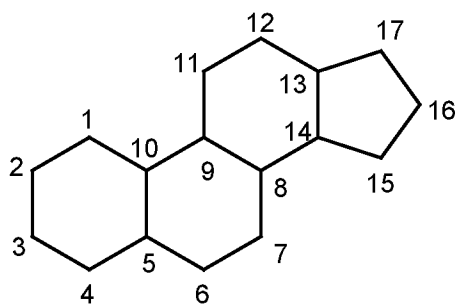
[0023] Для целей данного изобретения трансмембранная последовательность «гетерологична», если последовательность получена или производна от встречающегося в природе белка, который отличается от белка, из которого была получена или от которого

производна антигенная полипептидная последовательность. Типичные трансмембранные домены встречающихся в природе белков, находящихся применение в настоящем изобретении, описаны далее в этом документе.

[0024] Ради удобства, липид(ы), выбранные в части (ii) выше, будут обозначаться ниже как DMPG/DMTAP, что, как подразумевается, обозначает DMPG, DMTAP или смесь этих двух веществ. В определенных вариантах воплощения относительное процентное содержание DMPC, DMPG/DMTAP и стерина составляет от 50% до 98% DMPC: от 1% до 25% DMPG/DMTAP : от 1% до 25% стерина, и в некоторых других вариантах воплощения от 70% до 98% DMPC : от 1% до 15% DMPG/DMTAP : от 1% до 15% стерина. При этом не подразумевается, что в липосоме отсутствуют другие компоненты; вместо этого, эти числа обозначают относительные процентные количества DMPC, DMPG/DMTAP, и стерина в молярных соотношениях друг к другу. В определенных вариантах воплощения липосома может также содержать один или более дополнительных компонентов, которые хорошо известны в данной области техники, таких как пептидогликан, липопептид, липополисахарид, монофосфориллипид А, липотейхоевая кислота, резиквимод, имиквимод, флагеллин, олигонуклеотиды, содержащие неметилованные CpG-мотивы, α -галактозилцерамид, мурамилдипептид, полностью транс-ретиноевую кислоту, двухцепочечную вирусную РНК, белки теплового шока, диоктадецилдиметиламмония бромид, катионные поверхностно-активные вещества, агонисты toll-подобного рецептора, димиристоилтриметиламмонийпропан и агонисты nod-подобного рецептора.

[0025] В предпочтительных вариантах воплощения эти относительные процентные содержания составляют от 70% до 85% DMPC: от 5% до 15% DMPG/DMTAP : от 10% до 15% стерина и, более предпочтительно, приблизительно 75% DMPC, приблизительно 10% DMPG/DMTAP и приблизительно 15% стерина. При использовании в этом контексте термин «приблизительно» обозначает +/- 10% от заданного значения. DMPG особенно предпочтителен в качестве липида, выбранного в части (ii) выше.

[0026] Термин «стерин» при использовании здесь обозначает любую молекулу, имеющую структуру из 4 колец, характерную для стероидов, и гидроксильное (-OH) или эфирное (-OR) замещение в положении 3 углеродного атома:



[0027] Опытному специалисту будет понятно, что стерин может быть дополнительно замещен одной или более других кольцевых углеродных структур и может также содержать различные двойные связи в кольцах. В определенных вариантах воплощения стерин выбран из группы, состоящей из холестерина, холестерина хлороформата, стигмастерина, ситостерина, эргостерина, ланостерина, десмостерина и кампестерина. Не предполагается, что этот перечень исчерпывающий.

[0028] Как описано в настоящему документе, будет преимуществом, если антигенный полипептид приготовлен в виде слитого белка, который растворим в водном растворе несмотря на наличие гидрофобного трансмембранного домена. Введение водорастворимой антигенной конструкции (1) допускает получение конструкции отдельно от липосом с использованием водных систем экспрессии из организма в виде слитого белка или по обычным химическим способам синтеза в водных растворах, и (2) допускает последующие стандартные водные процедуры очистки. См. WO00/016746, которая включена в настоящую заявку во всей полноте, включая все таблицы, фигуры и пункты формулы изобретения.

[0029] Для целей данного изобретения два полипептида считаются «непосредственно связанными» друг с другом, если в пептидной связи, соединяющей два полипептида, отсутствуют другие химические связи, и два полипептида считаются «связанными опосредованно», если два полипептида соединяет связующая химическая структура. Примером опосредованного связывания может служить один или более аминокислотных остатков, дисульфидная связь или бифункциональный химический перекрестно-сшивающий реактив. Не предполагается, что этот перечень исчерпывающий. В данной области техники хорошо известны способы ковалентного связывания двух полипептидных последовательностей. К примеру, антигенный полипептид может быть синтезирован или экспрессирован как единственный «слитый» белок, содержащий и остатки внеклеточного домена M2, и остатки трансмембранного домена с использованием стандартных способов молекулярной биологии. В случае, если остатки внеклеточного домена M2 и остатки трансмембранного домена синтезируются или экспрессируются в

виде отдельных молекул, то могут использоваться химические перекрестно сшивающие агенты, например, такие, как обсуждается в Wong, *Chemistry of Protein Conjugation and Cross-linking*, CRC Press, Бока Ратон, Флорида, 1991. Эти реагенты обычно предоставляют функциональные группы, которые связываются с аминокислотными боковыми цепями пептидов. Фрагменты, на которые может воздействовать перекрестно-сшивающий агент, включают первичные и ϵ -амины, сульфгидрилы, карбонилы, гидроксилы и карбоксильные кислоты. Помимо этого, множество реакционных групп может быть связано неселективно с использованием перекрестно-сшивающего агента, такого как фотореактивные фенилазиды. Две последовательности могут быть непосредственно связаны концами, либо между двумя интересующими полипептидными последовательностями могут быть включены дополнительные сшивающие атомы или аминокислотные остатки.

[0030] В данной области техники хорошо известны способы, подходящие для получения липосом из липидных смесей. См., к примеру, Basu & Basu, *Liposome Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology)*, Humana Press, 2002; Gregoriadis, *Liposome Technology, 3rd Edition*, Informa HealthCare, 2006. Предпочтительные способы включают экструзию, гомогенизацию и ультразвуковые способы, описанные там. Типичный способ получения липосом по изобретению, который включает высушивание липидной смеси с последующей гидратацией в водном носителе и обработкой ультразвуком для получения липосом, описан ниже. Предпочтительные стероидные производные, способы ковалентного связывания иммуногенных полипептидов или углеводов с такими производными и ковалентные сшивки обсуждаются более подробно выше и ниже.

[0031] В определенных вариантах воплощения липосомы предоставляются имеющими средние размеры, лежащие в конкретном интервале, поскольку размер может влиять на эффективность захвата липосом при введении через слизистую и/или выведения при внутривенном введении. Размер липосом может быть определен способами, хорошо известными в данной области техники, включая фотонно-корреляционную спектроскопию, динамическое светорассеяние *и т.д.* В предпочтительных вариантах воплощения липосомы имеют по большей части от 50 до 500 нм в диаметре, более предпочтительно, по большей части от 50 до 300 нм в диаметре. Термин «по большей части» при использовании здесь в этом контексте обозначает, что по меньшей мере 75%, более предпочтительно, 80%, и наиболее предпочтительно по меньшей мере 90% липосом находятся в указанном интервале.

[0032] В определенных вариантах воплощения относительное процентное содержание DMPC, DMPG/DMTAP и стерина составляет от 50% до 98% DMPC: от 1% до 25% DMPG/DMTAP : от 1% до 25% стерина, и в некоторых других вариантах воплощения от

70% до 98% DMPC : от 1% до 15% DMPG/DMTAP : от 1% до 15% стерина. Как обсуждается выше, при этом не подразумевается, что в липидной смеси (и, следовательно, в липосомах) отсутствуют другие компоненты; вместо этого, эти числа обозначают относительные процентные количества DMPC, DMPG/DMTAP, и стерина в молярных соотношениях друг ко другу. В определенных вариантах воплощения липидная смесь может также содержать один или более дополнительных компонентов, которые хорошо известны в данной области техники, таких как пептидогликан, липопептид, липополисахарид, монофосфориллипид А, липотейхоевая кислота, резиквимод, имиквимод, флагеллин, олигонуклеотиды, содержащие неметилованные CpG-мотивы, α -галактозилцерамид, мурамилдипептид, полностью транс-ретиноевую кислоту, двухцепочечную вирусную РНК, белки теплового шока, диоктадецилдиметиламмония бромид, катионные поверхностно-активные вещества, агонисты toll-подобного рецептора, димиристоилтриметиламмонийпропан и агонисты nod-подобного рецептора.

[0033] В предпочтительных вариантах воплощения эти относительные процентные содержания составляют от 70% до 85% DMPC: от 5% до 15% DMPG/DMTAP : от 10% до 15% стерина и, более предпочтительно, приблизительно 75% DMPC, приблизительно 10% DMPG/DMTAP и приблизительно 15% стерина. При использовании в этом контексте термин «приблизительно» обозначает +/- 10% от заданного значения. DMPG особенно предпочтителен в качестве липида, выбранного в части (ii) выше.

[0034] Предпочтительные концентрации антигенного полипептида в итоговой композиции находятся в пределах от приблизительно 0,05 до 1 мг/мл, а наиболее предпочтительно — от приблизительно 0,1 до 0,6 мг/мл. При использовании в этом контексте термин «приблизительно» обозначает +/- 10% от заданного значения.

[0035] В определенных вариантах воплощения способы дополнительно содержат выбор липосом с конкретными интервалами среднего размера. Размер липосом может быть выбран, к примеру, экструзией водного носителя, содержащего липосомы, через мембраны с предустановленным размером пор и собиранием материала, протекающего через мембрану. В предпочтительных вариантах воплощения липосомы выбирают так, чтобы они имели по большей части от 50 до 500 нм в диаметре, более предпочтительно, по большей части от 50 до 200 нм в диаметре и наиболее предпочтительно, по большей части от 50 до 150 нм в диаметре. Термин «по большей части» при использовании здесь в этом контексте обозначает, что по меньшей мере 75%, более предпочтительно по меньшей мере 80%, и наиболее предпочтительно по меньшей мере 90% липосом находятся в указанном интервале.

[0036] В определенных вариантах воплощения трансмембранная последовательность получена или происходит от гетерологичного мембранного белка, который в своем нативном окружении обладает сигнально-якорной последовательностью. При использовании здесь, это обозначает полипептидную последовательность, содержащую по меньшей мере 10 последовательных остатков (в определенных вариантах воплощения по меньшей мере 15 последовательных остатков, в других вариантах воплощения по меньшей мере 18 последовательных остатков, в других вариантах воплощения по меньшей мере 20 последовательных остатков, а в некоторых вариантах воплощения 25 или более последовательных остатков) трансмембранного домена белка, такого как мембранный белок II типа или III типа. Такие последовательности обычно обладают длиной, достаточной для пересечения липидного бислоя (начиная от приблизительно 15-30 остатков; более предпочтительно, начиная от приблизительно 18-25 остатков), и, как предсказывается, образуют альфа-спираль с гидрофобностью (показатель по Eisenberg et al.) приблизительно +1,5/остаточной. В этом контексте термин «приблизительно» обозначает +/- 10% от заданного значения. В мембранных белках II типа и III типа отсутствует отщепляемый N-терминальный сигнальный пептид, контролирующий внедрение в мембрану и топологию, вместо этого они вводятся в мембраны поттрансляционно через гидрофобную «сигнально-якорную последовательность», которая является нерасщепляемой сигнальной последовательностью, которая определяет транслокацию полипептида и прикрепляет белок к мембране.

[0037] Одним примером такого белка служит цитохром b5. Полипептид цитохрома b5 состоит из двух отдельных доменов, связанных трипсин-чувствительным сегментом. Аминопроксимальный домен представляет собой каталитический домен, участвующий в транспортировке электронов, а гидрофобный «карбоксильно-проксимальный» домен служит для удержания белка на мембране. Другие подходящие однопроходные мембранные белки, известные в данной области техники, включают Муцина-4 бета цепь, рецептор трансферрина, TNFRSF13B, Аминопептидазу N, Дипептидилпептидазу 4, факторсинтаксина некроза опухолей 3, VclXL и R9AP. Не предполагается, что этот перечень исчерпывающий.

[0038] В определенных альтернативных вариантах воплощения трансмембранная последовательность получена или происходит от гетерологичного мембранного белка, который является многопроходным мембранным белком, обладающим множеством сигнально-якорных последовательностей, таким как бактериородопсин, G белок-сцепленные рецепторы, например, CCRs1-10, CXCR1, ацетилхолиновый рецептор, адренормедуллиновый рецептор и т.д., цитохромоксидаза С, никотиновый

ацетилхолиновый рецептор, mGluRs и аквапорин. Не предполагается, что этот перечень исчерпывающий.

[0039] Примеры подходящих трансмембранных доменов содержат 10 или более последовательных остатков из одной или более следующих последовательностей. В данной области техники известно множество других подобных доменов, и могут быть предсказаны последовательности так, чтобы образовывать трансмембранный домен, как рассчитано с использованием DAS сервера (Cserzo, M., E. Wallin, I. Simon, G. von Heijne, and A. Elofsson. 1997. *Protein Eng.* 10:673–676).

R9AP TM (SEQ ID NO: 17):	LIVSLLLCGTALVAITL
mGluR1 TM (SEQ ID NO: 18):	IIAIAFSCGLVTLFVTLIFVLY
Cyt b5a TM (SEQ ID NO: 19):	VIPAISAVAVALMY
Cyt b5a TM bov (SEQ ID NO: 20):	LIPAISALFVALIY
Cyt b5a TM sus (SEQ ID NO: 21):	VIPAISALVVSLMY
Cyt b5a TM xen (SEQ ID NO: 22):	LIPAAAVVLLGFMY
BclXL TM (SEQ ID NO: 23):	TGMTVAGVVLLGS
Stx 3 TM (SEQ ID NO: 24):	IMILICCVILAIVIASTI
MGC80327 xen TM (SEQ ID NO: 25):	IIPGISAMIVALMY

[0040] Взяв последовательность Cyt b5a в качестве типичного гидрофобного трансмембранного домена, антигенный слитый белок по настоящему изобретению может содержать любую непрерывную часть одной из следующих последовательностей или последовательность полностью, при условии, что последовательность содержит по меньшей мере подчеркнутые остатки:

Homo sapiens (Swiss-Prot P00167) (SEQ ID NO: 26)
 NKPPETLITTTIDSSSSWWTNWVIPAISAVAVALMYRLLYMAED

Ratus norvegicus (Swiss-Prot P00173) (SEQ ID NO: 27)
 AKPSETLITTVESNSSWWTNWVIPAISALVVVALMYRLLYMAED

Mus musculus (Swiss-Prot P56395) (SEQ ID NO: 28)
 AKPSDTLITTVESNSSWWTNWVIPAISALAVALMYRLLYMAED

Oryctolagus cuniculus (Swiss-Prot P00169) (SEQ ID NO: 29)
 SKPMETLITTVDSNSSWWTNWVIPAISALIVALMYRLYMADD

Gallus gallus (Swiss-Prot P00174) (SEQ ID NO: 30)

QKPAETLITTVQSNSSSSWSNWVIPAIAAIIVALMYRSYMSE

Sus scrofa (Swiss-Prot P00172) (SEQ ID NO: 31)

AKPSETLITTVESNSSWWTNWVIPAISALVVSLMYHFYTSEN

Equus Caballus (Swiss-Prot P00170) (SEQ ID NO: 32)

AKPVETLITTVDSNSSWWTNWVIPAISAVVVALMYRIYTAED

Mesocricetus auratus (Swiss-Prot P70116) (SEQ ID NO: 33)

AKPSESLITTVESNSSWWTNWVIPAVSALAVALMYRLYMGRR

Ovis aries (Swiss-Prot C9E8M7) (SEQ ID NO: 34)

TKPSESIITTTIDSNSSWWTNWLIPAISALVVVALMYHLYTSEN

Xenopus laevis (Swiss-Prot Q28EA4) (SEQ ID NO: 35)

KNQKGNDVLLTTSSSSSSSSWSSWLIPAAAVVLLGFMYRFYMVD

Bombyx mori (Swiss-Prot Q2F5S4) (SEQ ID NO: 36)

QYSWEDTAKTSETEASFVNSWKFPVLLGLALTLLYSYIFG

Olea europaea (Swiss-Prot O24651) (SEQ ID NO: 37)

KQPHYNQDKTSDFIKLLQFLVPLFILGVAVGIHFYTKSSA

Rhodospirillum rubrum (Swiss-Prot Q07P44) (SEQ ID NO: 38)

WCGKEATEAYATKTKGRAHTREADELLPKYRIGRFAP

Xenopus tropicalis (Swiss-Prot Q28EA4) (SEQ ID NO: 39)

QKPTETFITTTDSDSSWWSNWIIPGISAFIVALMYRFYMASE

Polyandrocampa misakiensis (Swiss-Prot Q9GV21) (SEQ ID NO: 40)

QEEQPQFVTTHESSMAETSSWSNWVIPAIVALVALVYRYYISN

[0041] Не предполагается, что вышеупомянутый перечень последовательностей белка сур b5 является исчерпывающим. Также, в данной области техники хорошо известны

другие подобные белки. Предпочтительно, такая полипептидная последовательность обладает по меньшей мере 70% процентной идентичностью с одной из последовательностей белка cyt b5, перечисленных выше по номеру доступа Swiss-Prot, а предпочтительно по меньшей мере 70%, более предпочтительно по меньшей мере 80%, и наиболее предпочтительно по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с человеческой последовательностью, обозначенной выше как SEQ ID NO: 26, среди всей длины в 42 остатка, указанных выше. Идентичность последовательности определяется при помощи Средства поиска основного локального выравнивания (BLAST) (Altschul, S.F. et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410), установленного на параметры по умолчанию.

Понятно, что в последовательность нуклеиновой кислоты могут быть внесены изменения с учетом вырожденности генетического кода с получением множества последовательностей нуклеиновых кислот, все из которых кодируют по существу один и тот же белок. В качестве примера, антигенный слитый белок по настоящему изобретению может содержать любую непрерывную часть одной из следующих последовательностей или последовательность полностью, при условии, что последовательность содержит по меньшей мере подчеркнутые остатки:

Xenopus laevis MGC80327 protein (Swiss-Prot Q6DE13) (SEQ ID NO: 41)
 QKPSETFITTTDSDSSWWSNWIIPGISAMIVALMYRFYMVSE

Macaca mulatta EMBL:CO646551 (SEQ ID NO: 42)
 SKPPETLITTVDSSSSWWTNWVIPAISAVAVALMYRLYMAED

[0042] В родственных аспектах настоящее изобретение относится к очищенному антигенному полипептиду, содержащему: первую полипептидную последовательность, выбранную так, чтобы установить гуморальный и/или клеточно-опосредованный иммунный ответ у животного, причем первая полипептидная последовательность связана прямо или опосредованно с N- или C-концом второй полипептидной последовательности, содержащей трансмембранную последовательность природного гетерологичного мембранного белка, либо происходящую от него, причем в указанной второй полипептидной последовательности имеется количество остатков, достаточное для пересечения липидного бислоя, по меньшей мере девять последовательных остатков из которых по прогнозу образуют альфа-спираль с показателем гидрофобности приблизительно 0,7 или выше, причем указанная очищенная антигенная полипептидная последовательность водорастворима.

[0043] В определенных типичных вариантах воплощения в настоящем изобретении предлагаются очищенные антигенные полипептиды, содержащие первую полипептидную последовательность, включающую по меньшей мере 10 последовательных остатков внеклеточного домена M2, последовательность которого была изменена так, чтобы удалить один или более остатков цистеина, естественным образом встречающихся в указанном внеклеточном домене M2, необязательно содержащие вторую полипептидную последовательность, содержащую трансмембранную последовательность природного гетерологичного мембранного белка, либо происходящую от него, причем в указанной второй полипептидной последовательности имеется количество остатков, достаточное для пересечения липидного бислоя, по меньшей мере девять последовательных остатков из которых по прогнозу образуют альфа-спираль с показателем гидрофобности приблизительно 0,7 или выше, причем указанная очищенная антигенная полипептидная последовательность является водорастворимой и, при этом, указанная первая полипептидная последовательность присоединена прямо или опосредованно к N- или C-концу указанной второй полипептидной последовательности.

[0044] В других аспектах изобретение относится к способам иммунизации животного. Эти способы включают доставку указанному животному парентеральным или энтеральным путем эффективного количества композиции по настоящему изобретению. Предпочтительные материалы, способы и условия для получения таких композиций обсуждаются подробно выше и ниже.

[0045] Предпочтительные энтеральные пути введения включают доставку через рот (оральный), назальный, ректальный и вагинальный пути. Предпочтительные парентеральные пути введения включают внутривенный, внутримышечный, подкожный и внутрибрюшинный пути.

[0046] В определенных вариантах воплощения способы по настоящему изобретению включают множественные доставки композиции по настоящему изобретению, которая обычно обозначается как протокол иммунизации «прайм/буст». В предпочтительных вариантах воплощения одна или более из прайм- и буст-доставок включают доставку животному парентеральным или энтеральным путем липосомной композиции по настоящему изобретению. По таким протоколам иммунизации прайм-доставка может осуществляться отличным путем введения, чем одна или более буст-доставок. К примеру, прайм-доставка может быть выполнена как подкожное введение иммуногена, а буст-доставка может быть выполнена как внутримышечное введение.

[0047] Помимо этого, прайм-доставка и одна или более буст-доставок интересующего антигена, могут быть «гомологичными», то есть такими, что и прайм, и буст включают

доставку липосомной композиции по изобретению; либо могут быть «гетерологичными», то есть такими, что одна из прайм- или буст-доставок включает доставку липосомной композиции по настоящему изобретению, в то время как другая доставка может выполняться на другой вакцинной платформе. Такие альтернативные вакцинные платформы включают, не ограничиваясь перечисленным, доставку антигена в нелипосомном вакцинном составе, доставку ДНК-вакцины, кодирующей антиген, доставку рекомбинантной вирусной вакцины *и т.д.*

[0048] В другом аспекте изобретение относится к способам получения липосомной композиции по настоящему изобретению. Эти способы включают экспрессию или синтез антигенного полипептида, в которых антигенный полипептид находится в мономерной форме в неденатурирующих условиях; очистку антигенного полипептида; добавление водного раствора, содержащего антигенный полипептид, к липидной смеси, содержащей (i) DMPC, (ii) DMPG, DMТАР или DMPG, и DMТАР и (iiI) по меньшей мере один стерин; высушивание антигенного полипептида и липидной смеси; и обработку ультразвуком высушенного антигенного полипептида и липидной смеси в присутствии водного носителя с образованием липосом.

[0049] Другой объект настоящего изобретения заключается в получении нуклеиновых кислот, сконфигурированных и упорядоченных для экспрессии интересующего полипептида в виде слитого белка с трансмембранной последовательностью встречающегося в природе гетерологичного мембранного белка или происходящей от него. Такие нуклеиновые кислоты, предпочтительно, выделяются или очищаются, как понимается в соответствии с терминами, определенными здесь.

[0050] В первом аспекте нуклеиновая кислота по настоящему изобретению обладает последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей слитый белок, последовательность которого содержит:
последовательность первой нуклеиновой кислоты, кодирующую тиоредоксин;
последовательность второй нуклеиновой кислоты, кодирующую интересующую полипептидную последовательность; и
последовательность третьей нуклеиновой кислоты, кодирующую трансмембранную последовательность природного гетерологичного мембранного белка, либо происходящую от него, причем в указанной второй полипептидной последовательности имеется количество остатков, достаточное для пересечения липидного бислоя, по меньшей мере девять последовательных остатков из которых по прогнозу образуют альфа-спираль с показателем гидрофобности приблизительно 0,7 или выше,

отличающуюся тем, что указанная последовательность нуклеиновой кислоты сконфигурирована так, что при экспрессии нуклеиновой кислоты тиоредоксин экспрессируется N-терминально к трансмембранной последовательности.

[0051] В определенных вариантах воплощения нуклеиновые кислоты по настоящему изобретению дополнительно содержат одну или более дополнительных последовательностей нуклеиновой кислоты, облегчающих использование таких нуклеиновых кислот в системе экспрессии. Такие последовательности нуклеиновой кислоты могут включать последовательности контроля экспрессии, такие как последовательность промотора и сайт связывания рибосомы, который функционально связан с такими нуклеиновыми кислотами, формируя вектор экспрессии. Дополнительные последовательности нуклеиновых кислот включают маркеры аффинности, маркеры детектирования и/или сайты протеазного расщепления. Не предполагается, что этот перечень исчерпывающий.

[0052] В различных вариантах воплощения порядок последовательностей нуклеиновых кислот в таком векторе сконфигурирован так, что порядок экспрессии от N-конца к C-концу в слитом белке следующий: тиоредоксин – интересующая полипептидная последовательность – трансмембранная последовательность; либо тиоредоксин – маркер аффинности – сайт протеазного расщепления – интересующая полипептидная последовательность – трансмембранная последовательность; тиоредоксин – сайт протеазного расщепления – интересующая полипептидная последовательность – трансмембранная последовательность; либо тиоредоксин – трансмембранная последовательность – интересующая полипептидная последовательность; или тиоредоксин – маркер аффинности – сайт протеазного расщепления – трансмембранная последовательность – интересующая полипептидная последовательность; или тиоредоксин – сайт протеазного расщепления – трансмембранная последовательность – интересующая полипептидная последовательность. В каждом случае такая последовательность нуклеиновой кислоты является, предпочтительно, вектором экспрессии и функционально связана с подходящими последовательностями контроля экспрессии.

[0053] Как обсуждается ниже, экспрессия белковой последовательности, гетерологичной для хозяина экспрессии, часто может быть улучшена замещением редких кодонов в экспрессируемой рекомбинантно последовательности, на другие, которые более похоже отражают отклонение системы кодонов хозяина без изменения аминокислотной последовательности (обозначается как «оптимизация кодонов»). В различных вариантах воплощения по меньшей мере часть нуклеиновых кислот по настоящему изобретению,

являются кодон-оптимизированными. В качестве примера, если в качестве вида для экспрессии выбрана *E. coli*, то одна или более из первой, второй и третьей последовательностей нуклеиновых кислот, описанных выше, являются кодон-оптимизированными для учета отклонения кодонов, существующего у *E. coli*.

[0054] В различных вариантах воплощения вторая последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая интересующую полипептидную последовательность, может кодировать антигенную последовательность, полипептид-нацеленный лиганд (например, антитело или другую аминокислотную последовательность, связывающуюся с мишенью, называемой здесь «рецептором»), фузогенную полипептидную последовательность и т.д., которые гетерологичны и для тиоредоксина, и для трансмембранной последовательности.

[0055] В родственных аспектах настоящее изобретение относится к клетке-хозяину, трансформированной таким нуклеиновокислотным вектором. В определенных аспектах трансформированные клетки-хозяева могут быть выбраны с использованием выбираемого маркера, кодируемого вектором, и нуклеиновой кислоты, кодирующей слитый белок, экспрессируемый клеткой-хозяином. Необязательно, слитый белок может быть отделен от клеток хозяев и очищен в водной среде. Этот слитый белок затем может быть включен в липосомы, как обсуждалось выше, так, чтобы интересующая полипептидная последовательность отображалась на поверхности липосомы.

[0056] Следует понимать, что изобретение не ограничивается в своем применении конструктивными особенностями и размещением компонентов, описанных в последующем описании или проиллюстрированных в чертежах. Изобретение может включать варианты воплощения помимо описанных, которые могут практиковаться и выполняться различными путями. Также, следует понимать, что фразеология и терминология, используемая здесь, а также в реферате, предназначены для целей описания и не должны пониматься как ограничивающие.

[0057] С учетом сказанного, специалисты в данной области техники оценят, что концепция, на которой основано настоящее изобретение, может легко использоваться как основа для разработки других структур, способов и систем для осуществления некоторых целей настоящего изобретения. Таким образом, существенно, чтобы пункты формулы изобретения рассматривались как включающие такие эквивалентные конструкции в той мере, в которой они не отклоняются от сущности и объема настоящего изобретения.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ФИГУР

[0058] На фигурах 1-10 показаны графики гидрофобности различных полипептидных трансмембранных последовательностей для практического использования по настоящему изобретению, рассчитанные по методологии Eisenberg et al., J. Mol. Biol. (1984) 179:125-142.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0059] «Введение» в отношении человека, млекопитающего, субъекта-млекопитающего, животного, ветеринарного субъекта, плацебо-субъекта, исследовательского субъекта, подопытного субъекта, клетки, ткани, органа или биологической жидкости, обозначает, без ограничений, контактирование субъекта, клетки, ткани, органа или биологической жидкости и т.п. с экзогенным лигандом, реагентом, плацебо, малой молекулой, фармацевтическим средством, терапевтическим средством, диагностическим средством или композицией. «Введение» может обозначать, например, терапевтические, фармакокинетические, диагностические, исследовательские, плацебо- и экспериментальные способы. Обработка клетки охватывает контактирование реагента с клеткой, а также контактирование реагента с жидкостью, причем жидкость находится в контакте с клеткой. «Введение» также охватывает обработки *in vitro* и *ex vivo*, например, клетки, реагентом, диагностической, связывающей композицией или другой клеткой.

[0060] «Агонист» по отношению к лиганду и рецептору включает молекулу, комбинацию молекул, комплекс или комбинацию реагентов, стимулирующие рецептор. К примеру, агонист гранулоцит-макрофагового колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ) может охватывать ГМ-КСФ, мутеин или производное ГМ-КСФ, пептидный миметик ГМ-КСФ, малую молекулу, имитирующую биологическую функцию ГМ-КСФ, либо антитело, которое стимулирует рецептор ГМ-КСФ.

[0061] «Антагонист» по отношению к лиганду и рецептору включает молекулу, комбинацию молекул или комплекс, которые ингибируют, противодействуют, понижают активность и/или снижают чувствительность рецептора. «Антагонист» охватывает любой реагент, который ингибирует конститутивную активность рецептора. Конститутивная активность рецептора это такая активность, которая возникает в отсутствие взаимодействия лиганд/рецептор. «Антагонист» также охватывает любой реагент, который ингибирует или предотвращает стимулированную (или регулируемую) активность рецептора. В качестве примера, антагонист рецептора ГМ-КСФ включает, не

ограничиваясь перечисленным, антитело, которое связывается с лигандом (ГМ-КСФ) и предотвращает его связывание с рецептором, или антитело, которое связывается с рецептором и предотвращает связывание лиганда с рецептором, или антитело, которое блокирует рецептор в неактивной конформации.

[0062] «Консервативно модифицированные варианты» применимо и к аминокислотным, и к нуклеиновокислотным последовательностям. По отношению к конкретным нуклеиновокислотным последовательностям, консервативно модифицированный вариант обозначает нуклеиновые кислоты, кодирующие одинаковые аминокислотные последовательности или аминокислотные последовательности с одним или более консервативными замещениями. Примером консервативного замещения служит замена аминокислоты одной из следующих групп на другую аминокислоту той же группы (Патент США № 5767063, выданный Lee, *et al.*; Kyte and Doolittle (1982) J. Mol. Biol. 157:105-132).

- (1) Гидрофобные: Норлейцин, Ile, Val, Leu, Phe, Cys, Met;
- (2) Нейтральные гидрофильные: Cys, Ser, Thr;
- (3) Кислотные: Asp, Glu;
- (4) Основные: Asn, Gln, His, Lys, Arg;
- (5) С остатками, влияющими на ориентацию цепи: Gly, Pro;
- (6) Ароматические: Trp, Tyr, Phe; и
- (7) Малые аминокислоты: Gly, Ala, Ser.

[0063] «Эффективное количество» охватывает, не ограничиваясь перечисленным, такое количество, которое способно ослабить, обратить, смягчить, предотвратить или диагностировать симптом или признак медицинского состояния или заболевания. Если явно или из контекста не следует иное, то «эффективное количество» не ограничивается минимальным количеством, достаточным для облегчения состояния.

[0064] «Ген» обозначает нуклеиновокислотную последовательность, кодирующую олигопептид или полипептид. Олигопептид или полипептид может быть биологически активным, антигенно активным, биологически неактивным или антигенно неактивным и т.д. Термин «ген» охватывает, например, сумму открытых рамок считывания (ОРС), которые кодируют специфический олигопептид или полипептид; сумму ОРС и нуклеиновые кислоты, кодирующие интроны; сумму ОРС и функционально связанный(е) промотор(ы); сумму ОРС и функционально связанный(е) промотор(ы), а также любые интроны; сумму ОРС и функционально связанный(е) промотор(ы), интрон(ы) и промотор(ы), а также другие регуляторные элементы, такие как энхансер(ы). В определенных вариантах воплощения «ген» охватывает любые последовательности,

необходимые в *cis* для регуляции экспрессии гена. Термин «ген» также относится к нуклеиновой кислоте, кодирующей пептид, охватывающий антиген или антигенно активный фрагмент пептида, олигопептида, полипептида, либо белка. Термин «ген» необязательно подразумевает, что кодируемый пептид или белок обладает какой-либо биологической активностью или даже, что пептид или белок антигенно активен.

Нуклеиновокислотная последовательность, кодирующая неэкспрессируемую последовательность, обычно расценивается как псевдоген. Термин «ген» также охватывает нуклеиновокислотные последовательности, кодирующие рибонуклеиновую кислоту, такую как рРНК, тРНК или рибозим.

[0065] «Лиганд» обозначает малую молекулу, пептид, полипептид или ассоциированную с мембраной, либо связанную с мембраной молекулу, агонистичную или антагонистичную к рецептору. «Лиганд» также охватывает связывающий агент, который не является агонистом или антагонистом, и не имеет свойств агониста или антагониста. По соглашению, если лиганд связан с мембраной первой клетки, рецептор обычно наблюдается на второй клетке. Вторая клетка может иметь такую же идентичность (такое же наименование), или отличную идентичность (отличное наименование), что и первая клетка. Лиганд или рецептор могут быть полностью внутриклеточными, то есть, они могут оставаться в цитозоле, ядре или каком-либо ином внутриклеточном компартменте. Лиганд или рецептор могут изменять свое положение, например, из внутриклеточного компартмента в наружную часть плазматической мембраны. Комплекс лиганда и рецептора называют «лиганд-рецепторным комплексом». Если лиганд и рецептор участвуют в сигнальном пути, то лиганд встречается в восходящем положении, а рецептор встречается в нисходящем положении сигнального пути. Лиганд может быть антителом. Термин «антитело» при использовании здесь обозначает пептид или полипептид, происходящий или моделированный либо в значительной степени закодированный геном иммуноглобулина или генами иммуноглобулина или их фрагментами, способный к специфическому связыванию антигена или эпитопа. См., к примеру, *Fundamental Immunology*, 3rd Edition, W.E. Paul, ed., Raven Press, Нью-Йорк (1993); Wilson (1994); *J. Immunol. Methods* 175:267-273; Yarmush (1992) *J. Biochem. Biophys. Methods* 25:85-97. Термин «антитело» включает антигенсвязывающие участки, т.е. «антигенсвязывающие сайты» (например, фрагменты, подпоследовательности, определяющие комплементарность области (CDR)), которые сохраняют способность связываться с антигеном, включая (i) Fab-фрагмент, моновалентный фрагмент, состоящий из доменов VL, VH, CL и CH1; (ii) F(ab')₂-фрагмент, двухвалентный фрагмент, содержащий два Fab-фрагмента, связанных дисульфидным

мостиком в шарнирной области; (iii) Fd-фрагмент, состоящий из доменов VH и CHI; (iv) Fv-фрагмент, состоящий из доменов VL и VH единственного плеча антитела, (v) dAb-фрагмент (Ward et al., (1989) Nature 341:544-546), который состоит из домена VH; и (vi) изолированную определяющую комплементарную область (CDR). Одноцепочечные антитела также включаются посредством ссылки в термин «антитело».

[0066] «Нуклеиновая кислота» обозначает дезоксирибонуклеотиды или рибонуклеотиды и их полимеры в одноцепочечной, двухцепочечной или многоцепочечной формах. Неограничивающими примерами нуклеиновых кислот служат, к примеру, кДНК, мРНК, олигонуклеотид и полинуклеотид. Конкретная нуклеиновокислотная последовательность может также косвенно охватывать «аллельные варианты» и «варианты сплайсинга».

[0067] «Функционально связанный» в отношении промотора и нуклеиновой кислоты, кодирующей мРНК, обозначает, что промотор может использоваться для начала транскрипции той нуклеиновой кислоты.

[0068] Термины «процентная идентичность последовательности» и «% идентичности последовательности» обозначают процентное количество сходства последовательностей, определенное при сравнении или выравнивании двух или более аминокислотных или нуклеиновокислотных последовательностей. Процентная идентичность может быть определена непосредственным сравнением информации о последовательностях двух молекул при выравнивании последовательностей, подсчетом точного количества соответствий между двумя выровненными последовательностями, делением на длину более короткой последовательности и умножением результата на 100. Процентная идентичность рассчитывается по алгоритму поиска гомологии Смита-Уотермана (см., к примеру, Kann and Goldstein (2002) Proteins 48:367-376; Arslan, et al. (2001) Bioinformatics 17:327-337).

[0069] Под «очищенный» и «выделенный» понимается, в отношении полипептида, что полипептид находится при практически полном отсутствии других биологических макромолекул, с которыми он связан в природе. Термин «очищенный» при использовании здесь обозначает, что идентифицированный полипептид часто составляет по меньшей мере 50%, более часто составляет по меньшей мере 60%, типично составляет по меньшей мере 70%, более типично составляет по меньшей мере 75%, наиболее типично составляет по меньшей мере 80%, обыкновенно составляет по меньшей мере 85%, более обыкновенно составляет по меньшей мере 90%, наиболее обыкновенно составляет по меньшей мере 95%, и как правило составляет по меньшей мере 98% по массе или больше от присутствующих полипептидов. Массы воды, буферных растворов, солей,

поверхностно-активных веществ, восстановителей, ингибиторов протеаз, стабилизаторов (включая добавленный белок, такой как альбумин) и вспомогательных веществ, и молекул с молекулярной массой ниже чем 1000, обычно не учитываются при определении чистоты полипептида. См., к примеру, обсуждение чистоты в Патенте США № 6090611, выданном Covacci, *et al.*

[0070] «Пептид» обозначает короткую последовательность аминокислот, в которой аминокислоты соединены друг с другом пептидными связями. Пептид может быть свободным или связанным с другой группой, такой как макромолекула, липид, олиго- или полисахарид и/или полипептид. Если пептид входит в состав полипептидной цепи, то термин «пептид» также может использоваться для конкретного обозначения короткой аминокислотной последовательности. «Пептид» может быть соединен с другой группой через пептидную связь или связь какого-либо иного типа. Пептид имеет по меньшей мере две аминокислоты в длину, а обычно, менее чем приблизительно 25 аминокислот в длину, где максимальная длина зависит от конкретных особенностей или окружения. Термины «пептид» и «олигопептид» могут использоваться взаимозаменяемо.

[0071] «Белок» обычно обозначает последовательность аминокислот, содержащую полипептидную цепь. Белок также может обозначать трехмерную структуру полипептида. «Денатурированный белок» обозначает частично денатурированный полипептид с остаточной трехмерной структурой, либо, иначе, практически случайную трехмерную структуру, т.е. полностью денатурированную. Изобретение охватывает реагенты и способы использования полипептидных вариантов, например, с гликозилированием, фосфорилированием, сульфатированием, образованием дисульфидной связи, деамидированием, изомеризацией, процессингом точек разрезания в сигнальной или лидерной последовательности, ковалентно или нековалентно связанными кофакторами, окисленными вариантами и т.п. Описано образование дисульфидно связанных белков (см., к примеру, Woycechowsky and Raines (2000) *Curr. Opin. Chem. Biol.* 4:533-539; Creighton, *et al.* (1995) *Trends Biotechnol.* 13:18-23).

[0072] «Рекомбинантный» при использовании по отношению, например, к нуклеиновой кислоте, клетке, животному, вирусу, плазмиде, пептиду, полипептиду, белку, вектору и т.д., обозначает модифицирование введением экзогенной, ненативной нуклеиновой кислоты, изменением нативной нуклеиновой кислоты, либо полным или частичным извлечением из рекомбинантной нуклеиновой кислоты, клетки, вируса, плазмиды или вектора. Рекомбинантный белок обозначает белок, производный, к примеру, от рекомбинантной нуклеиновой кислоты, вируса, плазмиды, вектора и т.д. «Рекомбинантная бактерия» охватывает бактерию, геном которой был сконструирован

рекомбинантными способами, например, посредством мутации, делеции, инсерции и/или реаранжировки. «Рекомбинантная бактерия» также охватывает бактерию, модифицированную так, чтобы включать рекомбинантную экстрагеномную нуклеиновую кислоту, например, плазмиду или вторую хромосому, или бактерию, у которой имеющаяся экстрагеномная нуклеиновая кислота была изменена.

[0073] «Селектируемый маркер» охватывает нуклеиновую кислоту, позволяющую выбирать или не выбирать клетку, содержащую селектируемый маркер. Примеры селектируемых маркеров включают, не ограничиваясь перечисленным, к примеру: (1) Нуклеиновую кислоту, кодирующую продукт, придающий устойчивость к токсичному в ее отсутствие веществу (например, антибиотику), или кодирующую чувствительность к безвредному в ее отсутствие веществу (например, сахарозе); (2) Нуклеиновую кислоту, кодирующую продукт, который в ее отсутствие отсутствует в реципиентной клетке (например, гены тРНК, ауксотрофные маркеры); (3) Нуклеиновую кислоту, кодирующую продукт, который подавляет активность генного продукта; (4) Нуклеиновую кислоту, кодирующую продукт, который может быть легко идентифицирован (например, фенотипические маркеры, такие как бета-галактозидаза, зеленый флуоресцентный белок (ЗФБ), белки клеточной поверхности, эпитопная метка, метка FLAG); (5) Нуклеиновую кислоту, которая может быть идентифицирована с помощью гибридизации, к примеру, ПЦР или молекулярными маяками.

[0074] «Специфическое» или «селективное» связывание, по отношению к лиганду/рецептору, нуклеиновой кислоте/комплементарной нуклеиновой кислоте, антителу/антигену или иной связывающейся паре (например, цитокину и цитокиновому рецептору) показывает реакцию связыванию, которая определяет присутствие белка в гетерогенной популяции белков и иных биологических веществ. Таким образом, в предназначенных условиях указанный лиганд связывается с конкретным рецептором и не связывается в значимом количестве с другими белками, присутствующими в образце. Специфическое связывание также может обозначать, например, что связывающее соединение, лиганд нуклеиновой кислоты, антитело или связывающая композиция, производные от антигенсвязывающего сайта антитела по рассматриваемому способу, связывается с его мишенью с аффинностью, которая часто является по меньшей мере на 25% большей, чаще по меньшей мере на 50% большей, чаще всего, по меньшей мере на 100% (2-кратно) большей, обычно по меньшей мере в десять раз большей, более обычно по меньшей мере в 20 раз большей и обычнее всего по меньшей мере в 100 раз большей, чем аффинность с другим связывающим соединением.

[0075] Термин «субъект» при использовании здесь обозначает человеческий или нечеловеческий организм. Таким образом, способы и композиции, описанные здесь, применимы и к человеческим, и к ветеринарным заболеваниям. В определенных вариантах воплощения субъекты являются «пациентами», т.е., живыми людьми, получающими медицинский уход по причине заболевания или состояния. Это определение включает лиц без установленного заболевания, проходящих обследование на предмет патологии. Предпочтительны субъекты, имеющие плазмодиевую инфекцию.

[0076] «Терапевтически эффективное количество» определяется как количество реагента или фармацевтической композиции, которое достаточно для оказания положительного эффекта у пациента, т.е. для понижения, предотвращения или ослабления симптомов излечиваемого заболевания. Если средство или фармацевтическая композиция содержат диагностическое средство, то «диагностически эффективное количество» определяется как количество, достаточное для получения сигнала, изображения или иного диагностического показателя. Эффективные количества фармацевтического состава будут варьироваться в зависимости от таких факторов как степень чувствительности лица, возраст, пол, масса тела лица и реакции гиперчувствительности лица (см., к примеру, Патент США № 5888530, выданный *Netti, et al.*).

[0077] «Лечение» или «терапия» (по отношению к заболеванию или состоянию) обозначает подход к получению благоприятных или желаемых результатов, предпочтительно включая клинические результаты. Для целей настоящего изобретения благоприятные или желательные результаты в отношении заболевания включают, не ограничиваясь перечисленным, одно или более из следующего: улучшение состояния, связанного с заболеванием, излечение заболевания, снижение тяжести заболевания, задержку прогрессирования заболевания, ослабление одного или более симптомов, связанных с заболеванием, повышение уровня качества жизни у лица, страдающего от заболевания и/или увеличение выживаемости. Аналогично, для целей настоящего изобретения благоприятные или желательные результаты в отношении состояния включают, не ограничиваясь перечисленным, одно или более из следующего: улучшение состояния, излечение состояния, снижение тяжести состояния, задержку прогрессирования состояния, ослабление одного или более симптомов, связанных с состоянием, повышение уровня качества жизни у лица, страдающего от состояния и/или продление выживаемости.

[0078] «Вакцина» охватывает профилактические вакцины. Вакцина также охватывает терапевтические вакцины, например, вакцину, которую вводят млекопитающему с

состоянием или нарушением, связанными с антигеном или эпитопом, предоставляемыми вакциной.

[0079] Цель вакцинной рецептуры заключается в том, чтобы предоставить комбинацию антигенов и адъювантов, которые способны сформировать достаточную популяцию запоминающих Т-клеток и В-клеток, чтобы быстро реагировать на патоген, опухолевую клетку и т.д., несущие интересующий антиген. Настоящее изобретение относится к способам получения липосомных вакцинных композиций, способам их производства и способам их применения для стимуляции иммунного ответа у животного, нуждающегося в этой цели.

[0080] Хотя в подробном описании ниже рассматриваются вакцины против гриппа и вируса герпеса, специалисту в данной области техники будет понятно, что эти типичные варианты воплощения не подразумеваются как ограничивающие.

[0081] По имеющимся данным, ежегодный грипп (также называемый «сезонным гриппом» или «человеческим гриппом») в США приводит к приблизительно 36000 случаям смерти и более чем 200000 случаям госпитализации каждый год. Его называют «сезонным», поскольку эпидемии гриппа обычно развиваются каждую зиму. Имеется два сезона гриппа, которые наблюдаются в разное время в Северном и Южном полушариях. По оценкам, во всем мире сезонный грипп ежегодно приводит к смерти от 250000 до 500000 людей. Большинство случаев смерти в индустриальных странах наблюдаются среди взрослых людей в возрасте 65 лет и старше. Сезонный грипп является седьмой причиной смертности в США, а экономические потери только в США по его причине оцениваются более чем в 80 миллиардов долларов. Известно три типа сезонного гриппа – А, В и С. Пожалуй, наиболее летальной эпидемией сезонного гриппа была пандемия гриппа в 1918 году (пандемия Испанского гриппа; грипп типа А, подтипа H1N1), которая продолжалась с 1918 по 1919 год. По оценкам, в течение этой эпидемии от болезни погибло от 20 до 100 миллионов людей.

[0082] Вирус гриппа А («IAV») является членом семейства вирусов Orthomyxoviridae. Вирусы гриппа А содержат одноцепочечный, сегментированный, обратносмысловой РНК-геном. Восемь сегментов РНК являются:

«НА», который кодирует вирусный гемагглютинин (приблизительно 500 молекул гемагглютинина необходимы для создания одного вириона);

«НА», который кодирует вирусную нейраминидазу (приблизительно 100 молекул нейраминидазы необходимы для создания одного вириона);

«NP», который кодирует вирусный нуклеопротеин;

«М», который кодирует два матричных белка М1 и М2 (последний является ионным каналом в вирусной оболочке) путем использования различных рамок считывания в одном и том же сегменте РНК (для создания одного вириона необходимо приблизительно 3000 молекул матричного белка);

“NS”, который кодирует неструктурные белки NS1 и NEP путем использования различных рамок считывания в одном и том же сегменте РНК;

«РА», который кодирует вирусную РНК-полимеразу;

«PB1», который кодирует другую РНК-полимеразу вместе с белком PB1-F2 путем использования различных рамок считывания в одном и том же сегменте РНК; и

«PB2», который кодирует РНК-полимеразу.

[0083] Таким образом, геном IAV кодирует одиннадцать белков (HA, NA, NP, M1, M2, NS1, NEP, PA, PB1, PB1-F2, PB2). IAV обычно классифицируют по подтипам, номенклатура которых учитывает номер H (гемагглютинин) и номер N (нейраминидаза). Постоянно появляются новые вирусы гриппа путем мутаций или перестановок генома. Геном IAV высокопластичен вследствие присущей ему высокой скорости мутации, что, вместе с сегментированной природой генома позволяет разным вирусным штаммам обмениваться целыми генами. Это приводит к непрерывной антигенной вариации вируса, по причине чего необходимо ежегодное изменение вакцин против IAV.

[0084] Защитный иммунный ответ, формируемый текущими вакцинами, как считается, в основном, базируется на вирусных белках гемагглютинине (HA) и нейраминидазе (NA). Вакцины против гриппа, используемые в Соединенных Штатах и во всем мире, производятся путем выращивания вируса в оплодотворенных куриных яйцах с последующим убиванием вируса или ослаблением живого вируса. Эта технология с использованием яиц для получения IAV-вакцины была разработана в 1950-х гг. Для получения текущих вакцин ежедневно необходимы миллионы 11-дневных оплодотворенных яиц. По причине непрерывной антигенной вариации IAV, вакцины, основанные на гриппе текущего сезона, не будут актуальными для следующего сезонного гриппа. Хотя может наблюдаться некоторая перекрестная защита против родственных штаммов гриппа, наилучшей защитой будет при использовании вакцины, специфически произведенной для будущего пандемического штамма вируса гриппа.

[0085] Проблемы с производством вакцины против H5N1 включают нехватку общих производственных мощностей и невозможность быстрого наращивания мощности (непрактично развивать систему, которая зависит от сотен миллионов специальных 11-дневных яиц на постоянной основе).

[0086] Для некоторых вакцин против IAV, основанных на современных техниках молекулярной биологии, были начаты предварительные клинические испытания. Хотя было описано несколько таких вакцин, направленных на белки вирусного гемагглютинаина (HA) и нейраминидазы (NA), также изучаются новые мишени, такие как антигены белков NP и M2.

[0087] Вирус простого герпеса принадлежит к семейству вирусов Herpesviridae. Генитальный герпес, вызываемый вирусом простого герпеса типа 2 (HSV2) является одним из наиболее частых заболеваний, передающихся половым путем у людей. Эпидемиологические исследования показывают, что 1 из 6 взрослых американцев инфицирован HSV2. Заболевают как здоровые, так и находящиеся под иммуносупрессией взрослые, и заболевание ассоциировано с повышением восприимчивости к инфекции вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ). Серьезное клинически заболевание может наблюдаться у новорожденных после переноса HSV2 от инфицированной матери, а у самих матерей повышена вероятность развития рака цервикального канала в сравнении с неинфицированными женщинами. Основным фактором, дающим вклад в перенос HSV2, является выделение вируса из полового тракта в отсутствие клинических симптомов. В настоящее время эффективной вакцины для предотвращения распространения заболевания не имеется. Некоторые кандидатные вакцины против HSV2, содержащие антигены, основанные на субъединице белка, не достигли цели обеспечения защитного иммунитета против инфекции или клинического заболевания HSV2. В свете безуспешных результатов, полученных с проверенными кандидатными вакцинами, того, что люди, инфицированные HSV2, более восприимчивы к инфекции ВИЧ, и факта, что выделение вируса часто наблюдается у «клинически бессимптомных» носителей HSV2, попытка разработать новые подходы к ведению заболевания HSV2, включая новые стратегии иммунизации, остается важной целью здравоохранения.

[0088] Две различные вакцины против HSV2, содержащие рекомбинантные формы гликопротеинов В и D (gB и gD, соответственно), прошли клинические испытания 3 Фазы. Одна из этих вакцин содержала рекомбинантные HSV2 gB и gD, скомбинированные с адьювантом MF59, с образованием эмульсии белков типа масло в воде. Вакцина стимулировала образование высоких уровней HSV2-специфических нейтрализующих антител у вакцинированных реципиентов, но не наблюдалось существенного влияния на длительность первого клинического эпизода или последующую частоту реактивации инфекции, что означает, что эта вакцина не была особо эффективной. Вторая HSV2-вакцина состояла из HSV2 gD и адьювантной системы AS04, содержащей алюминия

гидроксид и 3-деацетилованный монофосфориллипид А. Хотя исходя из предварительных результатов, можно было заключить, что эта вакцина была эффективна у HSV1 серонегативных женщин (но не у мужчин) при профилактике развития симптоматического генитального герпеса HSV2, недавние результаты более крупного исследования не подтвердили первоначальные сведения. Неожиданная безуспешность вакцины, основанной на GSK HSV2 gD, несомненно приведет к дальнейшему обсуждению роли антигена gD в качестве мишени для разработки эффективной HSV2 вакцины.

[0089] Известно множество возможных факторов, которые могут влиять на клиническую безуспешность этих составов вакцин. Один из наиболее очевидных заключается в том, что gD антиген сам по себе не содержит эпитопов, необходимых для обеспечения полного защитного иммунитета в гетерологичной человеческой популяции. Исследования на мышах и людях показывают, что CD8 и CD4 Т-клетки важны для контроля HSV2 инфекции. Хотя gD эпитопы распознаются человеческими CD4 Т клетками, не наблюдалось gD специфических CD8 Т клеток. Недавно было идентифицировано 47 новых CD8 Т клеточных эпитопов от HSV1 сероположительных лиц, и ни одна из этих CD8 Т клеток не отвечала на gD. Эти исследования показывают, что хотя белок gD может приводить к образованию нейтрализующих антител и стимулировать CD4 Т-клетки, он не индуцирует выраженного CD8 Т клеточного ответа, что наиболее подходит для удаления или контроля клеток с латентной инфекцией. В отсутствие CD8 Т клеток, вакцина gD по отдельности неспособна стимулировать защитный иммунный ответ у людей на инфекцию HSV2. Вторая возможность заключается в том, что использованная адъювантная система могла быть неоптимальной для стимуляции защитных иммунных ответных реакций. Испытанные клинически составы не содержали адъюванта для формирования сильного клеточного иммунного ответа. Наконец, в совокупную эффективность основанной на gD вакцины могут давать вклад другие факторы, такие как возможная утрата перекрестной защиты, обусловленная небольшими различиями штаммов HSV2, эндемичных для конкретного района. В совокупности, потребуются большие усилия, чтобы выявить действительно эффективную вакцину против HSV2 в рамках исследований, направленных на все возможные причины безуспешности кандидатных вакцин против HSV2.

[0090] Ранее липосомная вакцина HSV2 gD₁₋₃₀₆ (L-gD₁₋₃₀₆-HD) была испытана в мышинной модели острой инфекции HSV2 при интравагинальной (самки) или интаректальной (самцы или самки) нагрузке (Olson et al., Vaccine 28: 548-560, 2009, включено сюда посредством ссылки). Две дозы L-gD₁₋₃₀₆-HD, содержащей 60мкг gD₁₋₃₀₆-

HD и 15мкг монофосфориллипида А (MPL) на дозу, как сообщалось, обеспечивали защиту при интравагинальной нагрузке HSV2 (выживаемость 86-100%, $P \leq 0,0003$ vs контрольные липосомы; $P=0,06$ vs L-gD₁₋₃₀₆-HD без MPL). Как самцы, так и самки мышей (BALB/c и C57BL/6), иммунизированные L-gD₁₋₃₀₆-HD/MPL, были в значительной степени защищены против интаректальной нагрузки HSV2, с более высокими величинами выживаемости в сравнении с контрольными (71-100%, $P \leq 0,007$). L-gD₁₋₃₀₆-HD/MPL также обеспечивала повышенную выживаемость в сравнении с липосомной пептидной вакциной, L-gD₂₆₄₋₂₈₅-HD/MPL (самцы BALB/c, $P \leq 0,001$; самки BALB/c и самцы C57BL/6, $P=0,06$). У мышей, получавших L-gD₁₋₃₀₆-HD/MPL, также наблюдались минимальные признаки заболевания, снижалась вирусная нагрузка в спинном мозге, и у самок повышались титры нейтрализующих антител. Вакцина также стимулировала gD₁₋₃₀₆-HD специфические спленоциты у самцов и самок мышей со значительно повышенными уровнями IFN- γ в сравнении с IL-4 ($P \leq 0,01$), свидетельствуя об усилении Th1-ответной реакции.

[0091] Как обсуждалось выше, липосомные композиции по настоящему изобретению содержат липосомы, изготовленные с использованием димиристоилфосфатидилхолина («ДМФХ») и димиристоилфосфатидилглицерина («DMPG»), димиристоилтриметиламмоний-пропана («DMTAP»), либо DMPG и DMTAP вместе; и одного или более стероидов. Компоненты липосом могут быть встречающимися в природе или синтетическими. Стероиды также известны как стероидные спирты. Они представляют собой подгруппу стероидов с гидроксильной группой в 3 положении А-кольца.

[0092] Помимо этого, эти липосомные композиции содержат антигенный полипептид. Термин «антигенный полипептид» при использовании здесь обозначает полипептид, содержащий по меньшей мере один антигенный эпитоп, который чужероден для животного-реципиента и который при доставке животному полностью или частично в липосомных композициях, описанных здесь, стимулирует образование антигенспецифических антител и/или антигенспецифического Т-клеточного ответа. Антигенные полипептиды, которые могут быть использованы в практике по настоящему изобретению, могут происходить от, в качестве только примеров, вирусных патогенов, бактериальных токсинов, бактериальных патогенов, грибковых патогенов, злокачественных клеток. Предпочтительные антигенные пептиды содержат остатки, происходящие от внеклеточного домена белка IAV M2 и/или остатков белка HSV2 gD, покровного белка упаковки ДНК, покровного белка VP11/12, пластинчатого белка поры ядра, и/или оболочечного гликопротеина L.

[0093] Как описано здесь, антигенные полипептиды по настоящему изобретению включают, помимо антигенной интересующей последовательности, подходящий гидрофобный домен. Примеры подходящих антигенных последовательностей включают полипептидные последовательности, которые содержат один или более Т-клеточных эпитопов, последовательность белка IAV M2, последовательность белка HSV2, полученную из белка, выбранного из группы, состоящей из покровного затворного белка хозяина, Покровного белка VP13/14, субъединицы 1 рибонуклеотидредуктазы, субъединицы 2 рибонуклеотидредуктазы, Покровного белка VP11/12, Оболочечного гликопротеина В, ДНК-упаковочного оболочечного белка, пластинчатого белка поры ядра, многофункционального регулятора экспрессии, регулятора транскрипции, Белка инфицированной клетки 8, одноцепочечного ДНК-связывающего белка, протеазы созревания капсида, оболочечного гликопротеина I. На Фиг. 1-10 показаны профили гидрофобности по Eisenberg et al. (J. Mol. Biol. 179:125-142(1984) ряда типичных гидрофобных доменов встречающихся в природе белков, которые преимущественно используются по настоящему изобретению. Эти и другие последовательности гидрофобных доменов, предложенные в качестве примеров, имеют только примерный характер. Эти или другие гидрофобные последовательности могут быть модифицированы консервативными аминокислотными замещениями с получением дополнительных синтетических последовательностей с гидрофобным профилем, похожим, к примеру, на профиль трансмембранного домена человеческого цитохрома b5. Для целей изобретения профиль гидрофобности рассчитывали по методологии Eisenberg et al., с использованием следующих параметров: размер окна 9, относительный вес краев 100%, линейная вариация веса.

Масштабные факторы аминокислот были следующими:

Ala:	0.620	Arg:	-2.530	Asn:	-0.780	Asp:	-0.900	Cys:	0.290
Gln:	-0.850	Glu:	-0.740	Gly:	0.480	His:	-0.400	Ile:	1.380
Leu:	1.060	Lys:	-1.500	Met:	0.640	Phe:	1.190	Pro:	0.120
Ser:	-0.180	Thr:	-0.050	Trp:	0.810	Tyr:	0.260	Val:	1.080

[0094] Подходящие последовательности гидрофобной части домена обычно обладают длиной, достаточной для пересечения липидного бислоя (начиная от приблизительно 15-30 остатков; более предпочтительно, начиная от приблизительно 18-25 остатков), по меньшей мере девять последовательных остатков из которых по прогнозу образуют альфа-спираль с гидрофобностью (показатель Эйзенберга) приблизительно + 0,7. В этом контексте термин «приблизительно» обозначает +/- 10% от заданного значения. В

мембранных белках II типа и III типа отсутствует отщепляемый N-терминальный сигнальный пептид, контролирующий внедрение в мембрану и топологию, вместо этого они вводятся в мембраны поттрансляционно через гидрофобную «сигнально-якорную последовательность», которая является нерасщепляемой сигнальной последовательностью, которая определяет транслокацию полипептида и прикрепляет белок к мембране.

[0095] Слитые белки:

[0096] Как обсуждалось выше, способы ковалентного связывания иммуногенной полипептидной последовательности с гетерологичной трансмембранной последовательностью хорошо известны в данной области техники. Антигенные полипептиды по настоящему изобретению могут быть синтезированы химически или быть экспрессированы по методологии рекомбинантной ДНК. В различных вариантах воплощения один или более антигенных эпитопов экспрессируются в виде части слитого белка с трансмембранной последовательностью из гетерологичного однопроходного мембранного белка, обладающего сигнально-якорной последовательностью. Подобные рекомбинантные белки могут содержать антигенные последовательности, выбранные из группы, состоящей из вирусного оболочечного белка, вирусного покровного белка, бактериального белка внешней мембраны и эукариотного мембранного белка.

[0097] Слитые белки могут экспрессироваться в клеточных и бесклеточных системах. Для крупномасштабной экспрессии и очистки белка часто используют бактериальную экспрессию, обычно под контролем бактериального или T7 промотора, в зависимости от бактериального штамма и РСС (прокариотная рибосомосвязывающая последовательность). Нуклеиновые кислоты, кодирующие интересные полипептидные последовательности, функционально соединенные с подходящими последовательностями контроля экспрессии, сайтами ферментативного расщепления и т.д., необязательно фланкированные или отделенные спейсерными остатками, внедрены в подходящий вектор по стандартным способам, использующим рекомбинантную ДНК (см., в общем, Sambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Нью-Йорк, 1989, включено сюда посредством ссылки). Интересующие нуклеиновые кислоты в конечном итоге экспрессируются в виде антигенных полипептидов (со спейсерными или каркасными остатками или без таковых).

[0098] *E. coli* служит одним прокариотным хозяином, пригодным, в частности, для экспрессии антигенных полипептидов по настоящему изобретению. Иные микробные хозяева, пригодные для использования, включают бациллы, такие как *Bacillus subtilis* и другие *enterobacteriaceae*, такие как *Salmonella*, *Serratia* и различные виды *Pseudomonas*.

Для этих прокариотных хозяев можно также создать вектора экспрессии, которые обычно будут содержать последовательности контроля экспрессии, совместимые с клеткой-хозяином (например, точку начала репликации). Помимо этого, будет присутствовать любое количество хорошо известных промоторов, таких как лактозная промоторная система, триптофановая (трп) промоторная система, бета-лактамазная промоторная система или промоторная система фага лямбда. Промоторы обычно контролируют экспрессию, необязательно, с операторной последовательностью, и несут последовательности рибосомосвязывающих сайтов и тому подобного для начала и завершения транскрипции и трансляции.

[0099] Для экспрессии также могут использоваться и иные микроорганизмы, такие как дрожжи. *Saccharomyces* является предпочтительным хозяином, с подходящими векторами, обладающими последовательностями контроля экспрессии, такими как промоторы, включая 3-фосфоглицераткиназу или иные гликолитические ферменты, и точкой начала репликации, последовательностями останова и т. п., по необходимости.

[00100] Тканевая клеточная культура млекопитающих также может использоваться для экспрессии и продуцирования антигенных полипептидов по настоящему изобретению (см. Winnacker, *From Genes to Clones* (VCH Publishers, Нью-Йорк, Нью-Йорк, 1987). Было разработано определенное количество подходящих клеточных линий хозяев, способных секретировать интактные иммуноглобулины, включая клетки насекомых для экспрессии бакуловируса, клетки линий яичника китайского хомячка, различные линии клеток Cos, клетки HeLa, миеломные клеточные линии, трансформированные В-клетки и гибридомы. Векторы экспрессии для этих клеток могут включать последовательности контроля экспрессии, такие как точка начала репликации, промотор и энхансер (Queen *et al.*, *Immunol. Rev.* 89: 49-68 (1986)), а также необходимые сайты для процессинга информации, такие как рибосомосвязывающие сайты, сайты РНК-сплайсинга, сайты полиаденилирования и транскрипционные терминаторные последовательности. Предпочтительные последовательности контроля экспрессии представляют собой промоторы, происходящие от иммуноглобулиновых генов, SV40, аденовируса, вируса бычьей папилломы или цитомегаловируса.

[00101] Различные организмы часто характеризуются «кодонным сдвигом»; то есть степенью вариации частоты кодирования заданным кодоном конкретной аминокислоты у разных организмов. В общем, чем больше редких кодонов содержится в гене, тем менее вероятно, что гетерологичный белок будет экспрессироваться в этой конкретной системе-хозяине на приемлемом уровне. Эти уровни становятся даже ниже, если редкие кодоны появляются в кластерах или в N-терминальной части белка. Замещение редких кодонов в

экспрессируемой рекомбинантно последовательности, на другие, которые более похоже отражают отклонение системы кодонов хозяина без изменения аминокислотной последовательности (обозначаемое как «оптимизация кодонов») может повысить уровни экспрессии функционального белка. В различных вариантах воплощения по меньшей мере один процент любых неоптимальных кодонов изменен так, чтобы получить оптимальные кодоны, а более стандартно, изменено по меньшей мере, пять процентов кодонов, наиболее стандартно, изменено, по меньшей мере десять процентов, часто изменено по меньшей мере 20%, более часто изменено по меньшей мере 30%, наиболее часто по меньшей мере 40%, обычно изменено по меньшей мере 50%, более обычно изменено по меньшей мере 60%, наиболее обычно изменено по меньшей мере 70%, оптимально изменено по меньшей мере 80%, более оптимально изменено по меньшей мере 90%, наиболее оптимально изменено по меньшей мере 95%, и стандартно 100% из любых неоптимальных кодонов кодон-оптимизированы для экспрессии. Инструменты для генной оптимизации, такие как Gene Designer 2.0 (DNA2.0), OptimumGene™ (GenScript), OPTIMIZER (Puigbo et al., Nucl. Acids Res. 35 (Suppl 2): W126-31, 2007), GeneOptimizer® (GeneArt), Gene Composer (Lorimer et al., BMC Biotechnology 2009, 9:36 doi:10.1186/1472-6750-9-36) и способы, раскрытые в Патентах США 7561973, 7561972, хорошо известны в области техники и могут использоваться для оптимизации экспрессии желаемого слитого белка.

[00102] Способы введения векторов, содержащих интересующие полинуклеотидные последовательности, варьируются в зависимости от типа клетки-хозяина. К примеру, для прокариотных клеток часто применяется кальций-хлоридная трансфекция, в то время как для иных клеток-хозяев могут использоваться обработка фосфатом кальция или электропорация. (См., в общем, Sambrook *et al.*, *выше*).

[00103] В определенных вариантах воплощения слитый белок может содержать дополнительную пептидную последовательность, такую как маркер аффинности, маркер детектирования и/или сайт протеазного расщепления. Примеры таких маркеров аффинности/детектирования включают, не ограничиваясь перечисленным, strep-tag, глутатион S-трансферазу (GST), мальтозосвязывающий белок (MBP), тиоредоксин (Trx), кальмодулин-связывающий пептид (CBP), поли-Гис, FLAG, с-тус и гемагглютинин (HA). GST, MBP, Trx, CBP и поли-Гис позволяют очистку их родственных слитых белков на иммобилизованном глутатионе, мальтозе, фениларсиноксиде, кальмодулине, и металл-хелатирующих смолах, соответственно. Strep-tag, FLAG, с-тус и гемагглютинин (HA) позволяют иммуноаффинную очистку слитых белков с использованием доступных в продаже моноклональных и поликлональных антител, специфически распознающих эти

эпитопные метки. Специалисту в данной области техники будут понятны другие подходящие последовательности-метки. Аналогичным образом, множество протеолитических ферментов (например, трипсин, субтилизин, термолизин, химотрипсин, папаин и т.д.) и соответствующие сайты протеазного расщепления хорошо известны специалистам в данной области техники. В предпочтительных вариантах воплощения один или более протеолитических ферментов для использования по настоящим способам выбраны из группы, состоящей из фактора Ха, энтерокиназы, тромбина, протеазы вируса гравировки табака и протеазы человеческого риновируса 3С. В иных предпочтительных вариантах воплощения внедренный сайт ферментативного расщепления выбран из группы, состоящей из IEGR (SEQ ID NO: 55), DDDDK (SEQ ID NO: 56), LVPRGS (SEQ ID NO: 57), ENLYFQG (SEQ ID NO: 58) и LEVLFQGP (SEQ ID NO: 59).

[00104] Такие слитые белки могут также содержать химические структуры между полипептидами, которые были слиты. Два полипептида слиты «непосредственно», если последний остаток последовательности одного из пептидов соединен с первым остатком другой последовательности. Два полипептида слиты «непрямо», если между последним остатком последовательности одного из пептидов соединен и первым остатком другой последовательности лежат дополнительные химические структуры (такие как дополнительные аминокислоты, иногда обозначаемые как «сшивающие остатки»).

[00105] Химическое связывание белка

[00106] В качестве альтернативы слитым белкам, один или более антигенных эпитопов могут быть химически синтезированы или экспрессированы отдельно от трансмембранной последовательности из гетерологичного однопроходного мембранного белка, обладающего сигнально-якорной последовательностью, и отдельные пептиды, связанные при помощи химических связей. Химические перекрестно-сшивающие средства описаны во множестве книг и каталогов. См., к примеру, Wong, *Chemistry of Protein Conjugation and Cross-linking*, CRC Press, Бока-Ратон, Флорида, 1991. Эти реагенты часто предоставляют функциональные группы, которые связываются с аминокислотными боковыми цепями пептидов. При разработке перекрестно-сшивающего средства выполняется выбор используемых функциональных фрагментов. Выбор функциональных фрагментов полностью зависит от целевых участков, имеющихся у перекрестно-сшиваемых видов веществ. Некоторые виды (например, белки) могут предоставлять множество доступных участков для связывания (например, ε-аминогруппы лизина, сульфгидрильные группы цистеина, карбоксильные группы глутаминовой кислоты и т.д.), и выбор конкретного функционального фрагмента для включения в стерин может выполняться эмпирически для наилучшего сохранения интересующей биологической

характеристики (например, аффинность связывания антитела, каталитическая активность фермента и т.д.)

[00107] Связывание через аминокруппы:

[00108] Имидовый эфир и N-гидроксисукцинимидовые («NHS») эфиры обычно используются в качестве аминокруппических функциональных групп. NHS-эфиры при взаимодействии с первичными или вторичными аминами дают стабильные продукты.

Связывание выполняется эффективно при физиологическом pH, а NHS-эфирные перекрестно-сшивающие агенты более стабильны в растворе, нежели их имидатные аналоги. Гомобифункциональные NHS-эфирные конъюгаты зачастую используются для перекрестного сшивания аминокруппических белков по одноэтапной или двухэтапной реакциям. Первичные амины являются основными целями NHS-эфиров. Доступные α -аминокруппы, которые имеются на N-концах белков, взаимодействуют с NHS-эфирами с образованием амидов. Тем не менее, поскольку α -амины в белке не всегда доступны, становится важным взаимодействие с боковыми цепями аминокрупп. Хотя в боковых цепях азот имеется у пяти аминокрупп, только ϵ -аминокруппа лизина взаимодействует значимо с NHS-эфирами. Ковалентная амидная связь образуется при взаимодействии перекрестно-сшивающего агента NHS-эфира с первичными аминами с образованием N-гидроксисукцинимида.

[00109] Связывание через сульфгидрильные групппы:

[00110] Малеимиды, алкил- и арилгалиды, α -галоацилы и пиридилдисульфиды обычно используются в качестве сульфгидрил-специфических функциональных групп.

Малеимидная групппа специфична по отношению к сульфгидрильным групппам, если pH реакционной смеси держится в пределах pH 6,5 и 7,5. При pH 7 реакция малеимидов с сульфгидрилами протекает в 1000 раз быстрее, чем с аминами. Малеимиды не реагируют с остатками тирозина, гистидина или метионина. Если в достаточных количествах не присутствуют свободные сульфгидрилы, они часто могут быть получены восстановлением доступных дисульфидных связей.

[00111] Связывание через карбокисильные групппы:

[00112] Карбодиимиды связывают карбокисилы с первичными аминами или гидразидами, образуя амидные или гидразоновые связи. Карбодиимиды отличаются от других реакций конъюгации тем, что между карбодиимидом и связываемыми молекулами не образуется перекрестного мостика; вместо этого образуется пептидная связь между доступной карбокисильной групппой и доступной аминокруппой. Могут быть нацелены карбокисильные концы белков, а также боковые цепи глутаминовой кислоты и аспарагиновой кислоты. В присутствии избытка перекрестно-сшивающего агента может

происходить полимеризация, поскольку белки содержат и карбоксилы и амины. Перекрестного мостика не образуется, а амидная связь идентична пептидной связи, поэтому обратить перекрестное связывание невозможно без разрушения белка.

[00113] Неселективные реактивные группы:

[00114] Фотоаффинный реагент представляет собой соединение, которое химически инертно, но становится реактивным при воздействии ультрафиолета или видимого света. Арилазиды являются фотоаффинными реагентами, которые подвергаются фотолизу при длинах волн в пределах 250-460 нм с образованием реактивного арилнитрена. Арилнитрен реагирует неселективно с образованием ковалентной связи. Восстанавливающие средства должны использоваться с осторожностью, поскольку они могут восстановить азидную группу.

[00115] Связывание через остатки аргинина:

[00116] Глиоксали являются соединениями, подходящими для нацеливания гуанидинильной частью на остатки аргинина. Глиоксали нацеливаются на остатки аргинина при слабощелочном pH. Присутствует небольшая перекрестная реактивность (наивысшая при высоком pH) с остатками лизина.

[00117] Связывание через Карбонильные Группы:

[00118] Карбонилы (альдегиды и кетоны) реагируют с аминами и гидразидами при pH 5-7. Реакция с гидразидами протекает быстрее, чем с аминами, благодаря чему они пригодны для сайт-специфического перекрестного связывания. Карбонилы легко не присутствуют в белках; тем не менее, при мягком окислении фрагментов сахара с использованием натрия метапериодата vicинальные гидроксилы превращаются в альдегиды или кетоны. Для углеводов с восстанавливающим(и) концом(ами) карбонильная(ые) группа(ы) могут реагировать с гидразиновым фрагментом с образованием гидразоновой связи. S-HyNic является гетеробифункциональным сшивающим агентом, используемым для включения HyNic (6-гидразионикотинамид) фрагментов в молекулы посредством свободной аминогруппы при помощи активированного эфира (например, NHS). При добавлении HyNic гидразинового сшивающего агента возможно образование конъюгата в слегка кислотном буфере (100мМ NaPO₄, pH6). В случае углеводов без восстанавливающего конца может использоваться CDAP специфическая активация. В мягких условиях (pH 9,5 для активации и pH 7 для конъюгации), 1-циано-4-диметиламинопридиния тетрафторборат («CDAP») преобразует гидроксильные группы в цианиловые эфиры, которые затем образуют карбаматы в присутствии аминогрупп.

[00119] Полимерные вещества, необязательно включенные в химическое связывание, предпочтительно являются поли(алкиленоксидами). При использовании здесь термин «алкиленоксид» обозначает структуру $-X-O-$, где X является алкиленовой группой, ковалентно соединенной с кислородом O ; таким образом, поли(алкиленоксид) обозначает структуру $-(X-O)_m-$. Предпочтительно, чтобы поли(алкиленоксидный) полимер был неразветвленным гомополимером (например, полимером со структурой $-((CH_2)_n-O)_m-$ где n не изменяется), таким как поли(этиленоксид), производным от этиленгликоля. Также могут использоваться иные полимеры, такие как полиалкиленоксидные гомополимеры (например, полимеры метиленоксида, пропиленоксида, изопропиленоксида и бутиленоксида) и сополимеры или блокированные сополимеры поли(алкиленоксидов). В тех аспектах изобретения, в которых используются основанные на ПЭГ полимеры, предпочтительно, чтобы у них была средняя длина n от 40 до 1000 мономерных единиц. Молярные эквивалентные количества других алкиленоксидов могут быть легко определены специалистом в данной области техники так, чтобы были получены предпочтительные средние молекулярные массы у других гомополимеров и сополимеров.

[00120] Средние молекулярные массы по настоящему изобретению измеряются с использованием способа «численного среднего». В смеси полимерных молекул с разными молекулярными массами, в которой, количество молекул, имеющих конкретную молекулярную массу M_i , равно N_i , вероятность «численного среднего» с заданной массой составляет

$$P_i = \frac{N_i}{\sum_{j=0}^{\infty} N_j}$$

а численная средняя молекулярная масса определяется по формуле

$$\overline{M}_n = \sum_{i=0}^{\infty} \left(\frac{N_i}{\sum_{j=0}^{\infty} N_j} \right) M_i = \frac{\sum_{i=0}^{\infty} N_i M_i}{\sum_{j=0}^{\infty} N_j}$$

Численное среднее является простым арифметическим средним, отображающим общую массу присутствующих молекул, деленную на общее количество молекул. Численная средняя молекулярная масса полимера может быть измерена осмометрически с использованием давления паров по способам и при помощи оборудования, хорошо известного специалистам в данной области техники.

[00121] Альтернативные полимерные вещества, которые могут применяться вместо поли(алкиленоксидов) включают такие материалы как декстран, поливинилпирролидоны, полисахариды, крахмалы, поливиниловые спирты, полиакриламиды или иные похожие

полимеры. Обычному специалисту в данной области техники будет понятно, что изложенное выше имеет только иллюстративный характер, и не предполагается что оно ограничивает тип неантигенных полимерных веществ, пригодных для использования здесь.

[00122] «Введение», при использовании здесь по отношению к животному, включая, предпочтительно, млекопитающих, и наиболее предпочтительно, человека, обозначает доставку экзогенного реагента в клетку, ткань, орган или биологическую жидкость субъекта.

[00123] «Эффективное количество» при использовании здесь обозначает количество реагента, которое способно ослабить, обратить, смягчить или предотвратить симптом или признак медицинского состояния или заболевания. Если явно или иначе не следует иное, то «эффективное количество» не ограничивается минимальным количеством, достаточным для облегчения состояния, или количеством, обеспечивающим оптимальное или максимальное облегчение состояния. «Эффективное количество» в контексте введения вакцины - это такое количество, которое вызывает иммунный ответ у млекопитающего. Такое эффективное количество может не быть само по себе способным вызвать подобный иммунный ответ, но может использоваться вместе с предшествующей или последующей доставкой дополнительных реагентов (например, вакцинация прайм-буст). «Иммунологический ответ» или «иммунный ответ» при использовании здесь охватывает по меньшей мере один или более из следующих эффектов: продуцирование антител В-клетками; и/или активация супрессорных Т-клеток и/или Т-клеток, нацеленных непосредственно на антиген или антигены, присутствующие в интересующих векторах, композиции или вакцине.

[00124] В данной области техники известно множество анализов *in vitro* и *in vivo* для измерения иммунного ответа, включая измерение гуморального и клеточного иммунных ответов, которые включают, но не ограничиваются, стандартными иммуноанализами, такими как анализы RIA, ИФА; внутриклеточное окрашивание; Т клеточные анализы, включая, к примеру, анализы лимфопролиферации (активации лимфоцитов), анализы цитотоксических клеток CTL, или определение Т-лимфоцитов, специфических к антигену у сенсibilизированного субъекта. Такие анализы хорошо известны в данной области техники.

[00125] Приготовление липосом:

[00126] Приготовление липосом хорошо известно на предшествующем уровне техники. В общем, липосомы изготавливались по ряду различных способов, включая инъекцию этанола (Batzri *et al.*, *Biochem. Biophys. Acta.* 298:1015, 1973); инфузия эфира (Deamer *et al.*,

Biochem. Biophys. Acta. 443:629, 1976; Schieren *et al.*, *Biochem. Biophys. Acta.* 542:137, 1978); удаление поверхностно-активного вещества (Razin, *Biochem. Biophys. Acta.* 265:24 1972); выпаривание растворителя (Matsumato *et al.*, *J. Colloid Interface Sci.* 62:149, 1977); выпаривание органических растворителей из хлороформа в водных эмульсиях (REV's) (Szoka Jr. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75:4194, 1978); экструзия MLV или EUV через нуклеопористую поликарбонатную мембрану (Olson *et al.*, *Biochem. Biophys. Acta.* 557:9, 1979); замораживание и оттаивание фосфолипидных смесей (Pick, *Arch. Biochem. Biophys.*, 212:186, 1981), а также обработку ультразвуком и гомогенизацию. По соглашению, липосомы подразделяются по размерам, и 3-буквенная аббревиатура используется для обозначения типа обсуждаемых липосом. Многослойные пузырьки обычно обозначаются «MLV». Малые однослойные пузырьки обозначаются «SUV», а крупные однослойные пузырьки обозначаются «LUV». За этими обозначениями иногда приводят химический состав липосомы. Обсуждение номенклатуры и обзор известных типов липосом см. в Storm *et al.*, *PSIT*, 1: 19-3, 1998.

[00127] Липосомные композиции по изобретению могут дополнительно включать, либо в составе самой липосомы, либо в составе среды, в которой суспендированы липосомы, различные вспомогательные добавки, адъюванты, носители, вспомогательные вещества, модулирующие средства и т.п.

[00128] Носитель, который присутствует необязательно, является молекулой, которая сама по себе не индуцирует производство антител, вредных для индивидуума, получающего композицию. Подходящие носители обычно являются крупными, медленно метаболизируемыми макромолекулами, такими как белки, полисахариды, полимолочные кислоты, полиглицоловые кислоты, полимерные аминокислоты, сополимеры аминокислот, липидные агрегаты (например, капельки масла или липосомы) и неактивные вирусные частицы. Примеры конкретных носителей включают те, которые производны от полиметилметакрилатных полимеров, а также микрочастицы, производные от поли(лактидов) и поли(лактид-ко-гликолидов), известных как PLG. См., к примеру, Jeffery *et al.*, *Pharm. Res.* 10:362, 1993; McGee *et al.*, *J. Microencapsul.* 14: 197, 1997; O'Hagan *et al.*, *Vaccine* 11:149, 1993. Такие носители хорошо известны обычным специалистам в данной области техники.

[00129] Адъюванты включают, не ограничиваясь перечисленными, следующие: (1) соли алюминия, такие как алюминия гидроксид, алюминия фосфат, алюминия сульфат и т. д.; (2) составы эмульсий масло-в-воде (с иными специфическими иммуностимулирующими средствами, такими как мурамилпептиды (см. ниже) или компоненты клеточных стенок бактерий, или без них), такие, как, к примеру, (a) MF59 (Международная публикация №

WO 90/14837), содержащий 5% Сквалена, 0,5% Твин 80 и 0,5% Спан 85 (необязательно содержащий различные количества МТР-РЕ (см. ниже), хотя это и не требуется) в форме субмикронных частиц, полученных при помощи микрофлюидайзера, такого как микрофлюидайзер модели 110У (Microfluidics, Ньютон, Массачуссетс), (б) SAF, содержащий 10% Сквалена, 0,4% Твин 80, 5% плуроник-блокированного полимера L1 21 и MDP, либо микрофлюидизированных в субмикронную эмульсию, либо перемешанных на вихревой мешалке для получения эмульсии с более крупным размером частиц, и (в) адьювантная система RibitTM (RAS), (Ribi Immunochem, Хэмилтон, Миннесота); (3) один или более компонентов клеточной стенки бактерий из группы, состоящей из монофосфолипидов А (MPL), трегалозы димиколата (TDM) и скелета клеточной стенки (CWS), предпочтительно MPL+CWS (Detoxu); (4) сапониновые адьюванты, такие как StimulonTM (Cambridge Bioscience, Ворчестер, Массачуссетс); (5) Полный Адьювант Фрейнда (CFA) и Неполный Адьювант Фрейнда (IFA); (6) цитокины, такие как интерлейкины (IL-1, IL-2 и т.д.), макрофаговый колониестимулирующий фактор (М-КСФ), фактор некроза опухолей (ФНО), бета-хемокины (MIP, 1- альфа, 1-бета Rantes и т.д.); (7) детоксифицированные мутанты бактериального АДФ-рибозилирующего токсина, такого как холерный токсин (СТ), токсин коклюша (РТ) или E. coli термолабильный токсин (LT), в частности, LT- K63 (где лизин замещает аминокислоту дикого типа в положении 63) LT-R72 (где аргинин замещает аминокислоту дикого типа в положении 72), СТ-S109 (где серин замещает аминокислоту дикого типа в положении 109) и РТ-K9/G129 (где лизин замещает аминокислоту дикого типа в положении 9 и глицин замещает в положении 129) (см., к примеру, Международные публикации №№ WO93/13202 и WO92/19265); и (8) иные вещества, которые действуют как иммуностимулирующие средства для усиления эффективности композиции.

[00130] Предпочтительные адьюванты включают патоген-ассоциированные молекулярные паттерны (РАМР), которые опосредуют врожденную иммунную активацию через Toll-подобные рецепторы (TLR), (NOD)-подобные рецепторы (NLR), индуцируемые ретиноевой кислотой основанные на генах (RIG)-I-подобные рецепторы (RLR), и/или лектиновые рецепторы С-типа (CLR). Примеры РАМР включают липопротеины, липополипептиды, пептидогликаны, зимозан, липополисахариды, порины нейссерий, флагеллин, профиллин, α-галактозилцерамид, мурамилдипептид. Пептидогликаны, липопротеины и липотейхоевые кислоты являются компонентами клеточной стенки грамположительных. Липополисахариды экспрессируются большинством бактерий, одним из примеров служит MPL. Флагеллином является структурный компонент жгутиков бактерий, который секретируется патогенными и комменсальными бактериями.

α -галактозилцерамид (α -GalCer) является активатором клеток-натуральных киллеров Т (NKT). Мурамилдипептид является биоактивным пептидогликановым мотивом, общим для всех бактерий.

[00131] Другие предпочтительные адъюванты включают вирусную двухцепочечную РНК, воспринимаемую внутриклеточным рецептором TLR3; CpG-мотивы, присутствующие в бактериальной или вирусной ДНК или оцРНК, воспринимаемые TLR7, 8 и 9; полностью транс-ретиноевую кислоту; и белки теплового шока, такие как HSP70 и Grp96, которые являются высокоэффективными молекулами-носителями для перекрестного презентирования. Фармацевтические адъюванты включают резиквимод, агонисты TLR7/8 и имиквимод, который является TLR7 агонистом.

[00132] Фармацевтические композиции:

[00133] Липосомы по настоящему изобретению предпочтительно состоят в виде фармацевтических композиций для парентеральной или энтеральной доставки. Типичная фармацевтическая композиция для введения животному включает фармацевтически приемлемый носитель, такой как водные растворы, нетоксичные вспомогательные компоненты, включая соли, консерванты, буферы и тому подобное. См., к примеру, Remington's Pharmaceutical Sciences, 15th Ed., Easton ed. , Mack Publishing Co., pp 1405-1412 и 1461- 1487 (1975); The National Formulary XIV, 14th Ed., American Pharmaceutical Association, Вашингтон, Округ Колумбия (1975) . Примерами неводных растворителей служат пропиленгликоль, полиэтиленгликоль, растительное масло и инъекционные органические эфиры, такие как этилолеат. Водные носители включают воду, спиртовые/водные растворы, солевые растворы, парентеральные носители, такие как натрия хлорид, декстрозный раствор Рингера *и т.д.* Внутривенные носители включают растворы для возмещения жидкости и питательных веществ. Консерванты включают противомикробные средства, антиоксиданты, хелатирующие средства и инертные газы. рН и точная концентрация различных компонентов в фармацевтической композиции корректируются согласно обычным способам в данной области техники.

[00134] Повторные введения конкретной вакцины (гомологический бустинг), как было показано, эффективны для бустинга гуморальных ответов. Такой подход может быть неэффективным для бустинга клеточного иммунитета, поскольку имеющийся ранее иммунитет к вектору склонен ухудшать устойчивость презентирования антигена и формирование правильных воспалительных сигналов. Один подход для того, чтобы обойти эту проблему, заключается в последовательном введении вакцин, использующих различные системы доставки антигена (гетерологичный бустинг).

[00135] В режиме гетерологичного бустинга по меньшей мере одна прайм- или буст-доставка содержит доставку липосомных композиций, описанных здесь. Гетерологичная часть режима может включать доставку антигена с использованием одной или более из следующих стратегий:

ослабленные и/или инактивированные бактерии либо вирусы, содержащие интересующий антиген, являющиеся частицами, которые были обработаны в денатурирующих условиях для того, чтобы сделать их неэффективными или неспособными для патогенной инвазии; очищенные антигены, которые обычно являются природными антигенами, выделенными из клеточной культуры патогена или образца ткани, содержащего патоген, либо их рекомбинантная версия;

живые вирусные или бактериальные доставочные векторы, рекомбинантно сконструированные для экспрессии и/или секреции антигенов в клетках-хозяевах у субъекта. Эти стратегии основываются на генном инжиниринге вирусных векторов с тем, чтобы сделать их непатогенными и нетоксичными;

векторы-антигенпрезентирующие клетки (АПК), такие как вектор-дендритная клетка (ДК), которые содержат клетки, нагруженные антигеном или трансфицированные композицией, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую антиген; опухолевые клетки, к примеру, аутологические и аллогенные опухолевые клетки; и голые ДНК-векторы и голые РНК-векторы, которые могут вводиться при помощи генной пушки, электропорации, бактериальных призраков, микросфер, микрочастиц, липосом, поликатионных наночастиц и т.п.

[00136] Прайм-вакцина и буст-вакцина могут вводиться по любому одному или по комбинации следующих путей. В одном аспекте прайм-вакцина и буст-вакцина вводятся одинаковым путем. В другом аспекте прайм-вакцина и буст-вакцина вводятся различными путями. Термин «различные пути» охватывает, но не ограничивается перечисленным, различные участки тела, к примеру, участок, являющийся оральным, неоральным, энтеральным, парентеральным, ректальным, интранодальным (лимфатический узел), внутривенным, артериальным, подкожным, внутримышечным, внутриопухолевым, околоопухолевым, внутриопухолевым, инфузионным, слизистым, назальным, в цереброспинальное пространство или цереброспинальную жидкость и т.д., а также различные режимы, к примеру, оральный, внутривенный и внутримышечный.

[00137] Эффективное количество прайм- или буст-вакцины может вводиться в одной дозе, но не обязательно в одной дозе. Таким образом, введение может быть двумя, тремя, четырьмя, пятью, шестью, семью, восемью, девятью, десятью, одиннадцатью,

двенадцатью, тринадцатью, четырнадцатью, пятнадцатью, шестнадцатью, семнадцатью, восемнадцатью, девятнадцатью, двадцатью или более введениями вакцины. Если производится более одного введения вакцины, то введения могут быть разделены временными интервалами в одну минуту, две минуты, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять или более минут, интервалами приблизительно в один час, два часа, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 часов и так далее. В контексте часов, термин «приблизительно» обозначает плюс или минус любой временной интервал в пределах 30 минут. Введения также могут быть разделены временными интервалами в один день, два дня, три дня, четыре дня, пять дней, шесть дней, семь дней, восемь дней, девять дней, десять дней, 11 дней, 12 дней, 13 дней, 14 дней, 15 дней, 16 дней, 17 дней, 18 дней, 19 дней, 20 дней, 21 день, и их комбинациями. Изобретение не ограничивается интервалами дозирования, равно распределенными по времени, но охватывает дозирование при неравных интервалах, такое как прайм-схему, состоящую из введения на 1 сутки, 4 сутки, 7 сутки и 25 сутки, в качестве неограничивающего примера.

Примеры

[00138] Следующие примеры иллюстрируют настоящее изобретение. Эти примеры не ограничивают каким-либо образом охват данного изобретения.

[00139] Пример 1. Материалы и способы для вируса гриппа А

[00140] А. Вектор IAVM2e1-HD pET28a

[00141] Схема плазмиды IAVM2e1-HD pET28a была описана ранее [Ernst et al., 2006].

[00142] Б. Вектор IAVM2e1-HD pEV

Таблица 1. Оценивались пептидные и олигонуклеотидные последовательности различных последовательностей IAVM2e1

Конструкция	Аминокислотная последовательность	Олигонуклеотидная последовательность
IAVM2e1 5'	SLLTEVETPIRNEWGCRCNDS SD (SEQ ID NO: 43)	ATCAGATCT CGAA AACCTGTA CTTCAGTCCC TGCTGACCGAAGTTGAGA (SEQ ID NO: 44)
IAVM2e1 3' (C16S)	SLLTEVETPIRNEWGSR CNDS SD (SEQ ID NO: 45)	CGCAAGCTTGTCGACGTCG GAGGAGTCGTTACAACGA GAACCC (SEQ ID NO: 46)
IAVM2e1 3' (C18S)	SLLTEVETPIRNEWGCRS NDS SD (SEQ ID NO: 47)	CGCAAGCTTGTCGACGTCG GAGGAGTCGTTAGAACGA C (SEQ ID NO: 48)
IAVM2e1 3' (C16S,C18S)	SLLTEVETPIRNEWGSR SNDS SD (SEQ ID NO: 49)	CGCAAGCTTGTCGACGTCG GAGGAGTCGTTACTACGA CTACCCCA (SEQ ID NO: 50)
IAVM2e1 (1-15) 3'	SLLTEVETPIRNEWG (SEQ ID NO: 51)	ACAAAGCTTACCCCATTCG TTACGGATCGGGGTCTCAA CTTCGGT (SEQ ID NO: 52)
IAVM2e(1-15)-HD	<u>SLLTEVETPIRNEWGKLAAAN</u> <u>KPPETLITTIDSSSSWWTNWVI</u> <u>PAISAVAVALMYRLYMAED</u> (SEQ ID NO: 53)	
IAVM2e(1-15)-XD	SLLTEVETPIRNEWGKLQKPS ETFITTTDSDSSWWSNWIIPGI SAMIVALMYRFYMVSE (SEQ ID NO: 54)	

[00143] Чтобы получить белок IAVM2e1-HD, был синтезирован 5'-олигонуклеотидный праймер, кодирующий ген IAVM2e1, содержащий сайт ферментативной рестрикции Bgl II и сайт энтерокиназы (ЭК) (Integrated DNA Technologies). Чтобы получить белок LDR-IAVM2e1-HD, был синтезирован 5'-олигонуклеотидный праймер, кодирующий ген IAVM2e1, содержащий сайт ферментативной рестрикции Bgl II, сайт ЭК и LDR-последовательность вектора pET28a (Integrated DNA Technologies). Аналогично, был синтезирован 3'-олигонуклеотидный праймер, кодирующий ген гидрофобного домена, содержащий сайт ферментативной рестрикции Xho I. При получении гена IAVM2e1-HD праймеры использовались в полимеразной цепной реакции (ПЦР) для усиления вектора IAVM2e1-HD pET28a, ранее сконструированного при помощи Molecular Express.

Вкратце, в ПЦР-пробирку помещали 7,5 мкл буферного раствора 10X Pfx (Invitrogen), 1 мкл 50 mM MgCl₂, 1,5 мкл 10 mM дНТФ, 1 мкл 20 мкМ 5' и 3' праймера, 10 нг плазмиды IAVM2e1-HD pET28a, 1 мкл полимеразы Pfx, и доводили объем до 50 мкл. Реакционную смесь циклировали 25 раз (94°C в течение 1 минуты, 58°C в течение 1 минуты, 72°C в течение 1 минуты) и наконец выдерживали при 72°C в течение 7 минут. ПЦР-продукт очищали при помощи набора ПЦР-очистки (Qiagen, Чатсуорт, Калифорния). ПЦР-продукт и вектор pEV1 были ферментативно расщеплены при помощи Bgl II и Xho I (Invitrogen). Вектор pEV1 является композитным вектором pET32b и pET28a, у которого тиоредоксин-6Гис-множественный сайт клонирования pET32b был внедрен в pET28a. Вектор pEV1 предоставляет тиоредоксин-6Гис и тромбиновый сайт расщепления pET32b и устойчивость к канамицину от вектора pET28a. Расщепленная ДНК была подвергнута гель-очистке (Qiagen, Чатсуорт, Калифорния) а затем сшита и трансформирована в DH5- α *E. coli*. Плазмида была выделена из трансформированной *E. coli* и секвенирована, чтобы удостовериться в правильности последовательности, рамки считывания и ориентации гена.

[00144] В. Обрезанные и мутантные по цистеину конструкции IAVM2e1-HD

[00145] Чтобы получить мутантные белки IAVM2e1-HD, был синтезирован 5'-праймер, кодирующий сайт ферментативной рестрикции Bgl II, сайт протеазы вируса гравировки табака (ВГТ) и первые 22 оснований последовательности IAVM2e1 (Integrated DNA Technologies). Аналогично, 3'-праймеры, кодирующие последовательность различных мутантных генов IAVM2e1 и обрезанного IAVM2e1(1-15) были синтезированы так, чтобы они содержали сайт ферментативной рестрикции Hind III (Таблица 1). Вектор для этих конструкций содержит HD из предыдущей конструкции, в которой присутствует 5'-сайт Hind III из области, кодирующей HD.

[00146] Для каждого мутанта с заменой цистеина на серин, реакция была установлена с использованием 5'-праймера и одного из 3'-праймеров для амплификации IAVM2e1 области из шаблона pEV1-IAVM2e1, ранее сконструированного Молекулярной экспрессией. Вкратце, в ПЦР-пробирку помещали 7,5 мкл полимеразного буферного раствора 10X Pfx, 1 мкл 50 mM MgCl₂, 1,5 мкл 10 mM дНТФ, по 1 мкл каждого из 20 мкМ 5' и 3' праймера, 10 нг IAVM2e1-HD pEV1, 0,75 мкл полимеразы Pfx (Invitrogen) и доводили объем до 50 мкл дистиллированной водой. Реакционную смесь нагревали до 94°C в течение 5 минут для активации полимеразы. Затем ее подвергали 30 циклам при 95,5°C в течение 20 секунд и затем при 70°C в течение 40 секунд. После циклирования ее выдерживали в течение 10 минут при 68°C, затем сохраняли при 4°C. ПЦР-продукт очищали при помощи набора Qiaquick Spin (Qiagen). Затем ее подвергали ферментации используя по 5 единиц Bgl II и HinD III в 1X реакционном 2 буфере (Invitrogen) в течение 30 минут при 37°C. Каждый из продуктов был выделен из геля на 3,5% агарозном геле Nuseive. Из геля были вырезаны линии, и фрагменты ДНК были очищены при помощи набора для гелевой экстракции Qiaquick Gel Extraction. Концентрации ДНК были определены анализом на 2% агарозном геле, выполнявшемся в ряду с известным количеством стандартов низкомолекулярной ДНК с различными количествами ДНК.

[00147] В случае делеционного мутанта, включающего только аминокислоты 1-15, вставка достаточно коротка, чтобы нижний праймер перекрывал верхний праймер на 13 оснований. В этом случае в ПЦР-пробирке выполняли аналогичную реакцию, но без добавления шаблонной ДНК. По истечении 5-минутной фазы денатурации для активации полимеразы реакцию выдерживали при 48°C в течение 2 минут, затем температуру повышали до 70°C со скоростью подъема 20% и выдерживали при ней 5 минут. Этапы выдерживания при 48°C и 70°C повторялись еще раз, после чего выдерживали еще 10 минут при 70°C. Полученный продукт очищали в геле и анализировали по тем же процедурам, что использовались для немного более длинных мутантных ПЦР-продуктов IAVM2e1.

[00148] Вектор pEV1 с HD был получен ферментацией 3 мкг Плазмиды молекулярной экспрессии (MEP)-180 в 55 мкл 1X реакционного буферного раствора 2 в течение ночи при 37 °C с 24 единицами Bgl II и 10 единицами HinD III. Вектор был выделен из 1% агарозного геля. Вырезанная линия была очищена при помощи набора гелевой очистки Qiagen Gel Purification. Концентрация ДНК была определена анализом на 1% агарозном геле, выполнявшемся в ряду с известным количеством стандартов высокомолекулярной ДНК.

[00149] Каждый из ферментированных, очищенных ПЦР-продуктов затем был сшит с вектором в 10 мкл реакционной смеси, содержащей ПЦР-продукт в 3-кратном молярном отношении к вектору и 1х лигирующую смесь (Набор для клонируемого сшивания/трансформации Novagen Clonables Ligation/Transformation Kit) при 16°C в течение 80 минут. Один микролитр этой реакционной смеси затем был трансформирован в химически компетентные клетки Novablue высевные на LB-агарозных планшетах, содержащих 30 мг/л канамицина, и инкубирован в течение ночи. Поскольку последовательность IAVM2e1 так коротка, колонии были проанализированы и ПЦР-анализом колоний, и рестрикционным анализом ПЦР-продуктов. Реакцию ПЦР выполняли с использованием олигонуклеотидных праймеров Molecular Express (МЕО) МЕО-248 и МЕО-250. Сайт праймера МЕО-248 начинается на 540 пар оснований выше сайта Bgl II, а МЕО-250 заканчивается на 250 пар оснований ниже сайта HinD III на 5'-конце HD. Для последовательности из 23 аминокислот IAVM2e1 и 7 аминокислот сайта TEV необходимо 90 пар оснований. ПЦР-продукты, отражавшие фрагмент приблизительно в 900 пар оснований, были расщеплены Bgl II и HinD III в течение двух отдельных дополнительных реакций и проанализированы на гелях с 3,5% агарозы. Если на геле было видно, что присутствуют обе обрезанные стороны, то колонию выращивали в течение ночи в 16 мл LB с 30 мг/л канамицина, 225 об/мин, 37 °C. Плазмидную ДНК (Qiagen Plasmid Miniprep Kit) очищали для подтверждения секвенирования с праймерами МЕО-302 и МЕО-250 (Davis Sequencing). Результаты секвенирования сравнивались с целевой последовательностью ДНК при помощи «Выравнивания 2 или большего количества последовательностей» на BLAST.

[00150] SEQ ID NOS: 53 и 54 отображают конструкции IAVM2e1-HD, которые содержат гидрофобные домены, полученные из человеческого цитохрома b5 и белка Xenopus MGC80327, соответственно (подчеркнуто). Короткая связывающая последовательность аминокислот (двойное подчеркивание), происходящая от сайтов рестрикции, использовалась при изготовлении связей между остатками цитохрома b5 или Xenopus MGC80327 и последовательности IAVM2e1. Последовательность IAVM2e1 (не подчеркнута), таким образом, опосредованно слита с amino-концом гидрофобного домена через мостиковые аминокислотные остатки.

[00151] Г.Экспрессия IAVM2e1-HD конструкций

[00152] Для экспрессии белка IAVM2e1-HD, IAVM2e1-HD, содержащая pEV1 плазмиды или плазмиды IAVM2e1-HD-pET28a, были трансформированы в экспрессионном штамме *E. coli* C-43 (Lucigen). Начальная культура была выращена в бульоне без животных добавок LB (AthenaES) с добавкой 30 мг/л канамицина в течение

ночи в шюттель-аппарате с контролем окружающей среды G-25 (New Brunswick Scientific) при 37°C. В 4-2л стерильные колбы для шюттель-аппарата, содержащие 0,5 л бульона без животных добавок LB с добавкой 30 мг/л канамицина и 1% глицерина добавляли исходную культуру до оптической плотности (О.П.) 0,09-0,12 (A600nm). Культуры были инкубированы при 37°C с круговым встряхиванием (225 об/мин) до оптической плотности 0,5-0,7 (A600nm), во время чего культуру индуцировали 0,75 mM изопропил β-D-1-тиогалактопиранозидом (IPTG) (BioWorld). Культуру выдерживали еще 5 часов при 37°C при встряхивании. Бактерии были собраны центрифугированием (4000xg) в течение 25 минут при 4°C, осадок взвесили.

[00153] Д. Очистка 6His-IAVM2e1-HD

[00154] Для очистки белка 6His-IAVM2e1-HD бактерии были лизированы в буферном растворе с 8 М мочевины, 20 mM имидазола, 50 mM трис при pH 8,0 и гомогенизированы трехкратно при 15000 фунтов/кв. дюйм в микрофлюидизере M-110L (Microfluidics) для обнажения бактериальной ДНК и разрыва бактерий. Лизированные бактерии затем были центрифугированы (30000xg) для удаления клеточных обрывков. Очистка была достигнута инкубированием промытой, загруженной никелем хелатирующей агарозной смолы (Qiagen) с супернатантом, содержащим белок IAVM2e1-HD. Смолу промывали буфером с мочевиной, содержащим 20 mM имидазола в количестве 5 объемов колонки, затем промывали 5 объемами колонки 0,3% натрия дезоксихолата и, наконец, элюировали 250 mM имидазола, 50 mM натрия фосфата pH 7,9. Белковые фракции были подвергнуты электрофорезу 4%-12% ДСН-ПААГ и окрашены Кумасси Синим для выявления фракций, содержащих белок 6His-IAVM2e1-HD. Фракции элюирования 250 mM имидазолом, содержащие белок 6His-IAVM2e1-HD, были объединены и инкубированы с 0,1 мл уплотненной полимиксин В-агарозы для удаления остаточного эндотоксина. После обработки полимиксин В-агарозой белок был диализирован против 10 mM натрия фосфата, pH 7,2 для удаления остаточного имидазола, мочевины и натрия дезоксихолата. Концентрацию белка и концентрацию эндотоксинов определяли при помощи анализа с бицинхониновой кислотой и анализа с лизатом амебоцитов мечехвоста (Charles River Lab.), соответственно.

[00155] Е. Выделение IAVM2e1-HD из плазмиды pEV1

[00156] Осадок *E. coli* был суспендирован в 4 объемах буфера (м/об) 10 mM трис, pH 8,1; 20% сахарозы; 1 mM этилендиаминтетраацетата (ЭДТА). После того, как бактерии были полностью суспендированы, был добавлен порошок лизоцима (Sigma) до концентрации 1 мг/мл и раствор перемешивали при комнатной температуре в течение 20 минут. Сферопласты были собраны центрифугированием при 30000xg в течение 30 минут

при 4°C. Осадок был повторно суспендирован в ледяной дистиллированной воде, содержащей 1 мМ фенилметансульфонилфторида (ФМСФ), дезоксирибонуклеазу (10 единиц/мл), и раствор перемешивали 10 минут. Мембраны были собраны центрифугированием при 30000xg в течение 30 минут при 4°C. Осажденные мембраны были повторно суспендированы в 300 мл буфера с 10 мМ трис pH 8,1; 1 мМ ФМСФ. При перемешивании по каплям добавляли 3-[(3-холамидопропил)диметиламмоний]-1-пропансульфонат (CHAPS) (Sigma) (20% базовый раствор) до итоговой концентрации 1%. Смесь гомогенизировали трижды при 15000 фунтов/кв. дюйм в микрофлюидайзере M-110L (Microfluidics), а затем перемешивали еще 16 часов при 4°C. Смесь затем центрифугировали при 30000xg в течение 30 минут при 4°C, чтобы удалить посторонние частицы. К осветленному лизату добавляли натрия хлорид и имидазол до итоговой концентрации 500 мМ и 20 мМ, соответственно. Лизат затем инкубировали с уплотненной смолой Ni-NTA (Qiagen) в течение 45 минут при 4°C и вращении. Смолу собирали центрифугированием при 225xg в течение 5 минут и переносили в колонку Kontes 2,5 см x 25 см и промывали буферным раствором 10 мМ трис с pH 8,1, 20 мМ имидазола, 500 мМ NaCl и 1% CHAPS в количестве 10 объемов колонки. Белок вымывали 250 мМ имидазола, 20 мМ Трис с pH 8,0 и фракции собирали и анализировали ДСН-ПААГ-электрофорезом с окрашиванием Кумасси Синим. Содержащие целевой белок фракции были объединены и диализированы против 2 мМ трис, 10 мМ NaCl, pH 8,1 с порогом отсечения молекулярной массы (MWCO) в 15 кДа (Spectra-Por).

[00157] Ж. ДСН-ПААГ-электрофорез

[00158] Подлинность белка IAVM2e1-ND была определена путем демонстрации правильной молекулярной массы в гелях после ДСН-ПААГ-электрофореза, окрашенных кумасси синим. Концентрацию примесей в испытуемом образце оценивали путем сравнения интенсивности окрашивания этих линий с интенсивностью окрашивания стандартного белка известной концентрации.

[00159] 3. ВЭЖХ-анализ Тгх-6-His-IAVM2e1-ND

[00160] ВЭЖХ-анализ образцов белка выполняли на ВЭЖХ-системе Dionex GP50. Система состояла из градиентного насоса GP50, градиентной мешалки GM-3, автодозатора AS50 и фотодиодной детекторной матрицы PDA-100. Компоненты разделялись ОФ-ВЭЖХ на колонке Dionex Acclaim 120 C8 (4,6x250 мм; 5 мкм; 120 Å) с градиентным элюированием ацетонитрилом при 1 мл/мин, 25°C : растворитель А (10% ацетонитрила, 0,1% трифторуксусной кислоты); растворитель В (90% ацетонитрила, 0,1% трифторуксусной кислоты); (0 мин, 40% В); (1 мин, 40% В); (25 мин, 100% В).

Компоненты детектировали по УФ-поглощению на 220 нм. Как правило, для анализа

инжектировали по 20 мкл образца. Слитый белок тиоредоксин-IAVM2e(1-15)-HD элюируется приблизительно на 11-12 минутах. Чтобы оценить содержание слитого белка в области пика на 11-12 минуте использовали коэффициент пересчета $1,17 \times 10^{-4}$ мг/мAU220нм*мин. IAVM2e(1-15)-HD элюируется приблизительно на 14 минуте; чтобы оценить содержание IAVM2e(1-15)-HD в области пика на 14 минуте, использовали коэффициент пересчета $7,27 \times 10^{-5}$ мг/мAU220нм*мин.

[00161] И. Протеазное расщепление очищенного белка Ni-NTA

[00162] Рекомбинантные белки, содержащие сайт расщепления энтерокиназой, были расщеплены 10 нг энтерокиназы на миллиграмм белка (New England Biolabs) или 10 единицами TEV на миллиграмм белка (Invitrogen).

[00163] К. Ультрафильтрация для концентрирования IAVM2e1-HD и удаления тиоредоксина

[00164] Раствор расщепленного белка был концентрирован ультрафильтрацией через ячейку Amicon UF (Millipore), используя мембрану 30 кДа MWCO PES (Millipore) до концентрации IAVM2e1-HD приблизительно 20 мг/мл. Концентрированный образец затем был промыт 4 раза (каждое разбавление 1/10) буферным раствором 10 мМ натрия фосфата, pH 7,0, чтобы удалить основную часть тиоредоксинового компонента из концентрата.

[00165] Л. ВЭЖХ-очистка IAVM2e1-HD из pEV1

[00166] ВЭЖХ-очистка IAVM2e1-HD и LDR-IAVM2e1-HD выполнялась при помощи ВЭЖХ-системы Dionex Ultimate 3000. Система состоит из насоса Ultimate 3000 и детектора с регулируемой длиной волны Ultimate 3000. Белок отделяли при помощи ОФ-ВЭЖХ на колонке Vydac C8 (22x250 мм; 10 мкм; 300 А) с градиентным элюированием ацетонитрилом: растворитель А (вода, 0,1% трифторуксусной кислоты); растворитель В (ацетонитрил, 0,1% трифторуксусной кислоты); (0 мин, 5% В); (1 мин, 5% В); (60 мин, 100% В); (65 мин, 100% В); (70 мин, 5% В); (75 мин, 5% В). Компоненты детектировали по УФ-поглощению на 220 нм.

[00167] М. Ультрафильтрация для концентрирования очищенного IAVM2e1-HD

[00168] ВЭЖХ-фракции, содержащие IAVM2e1-HD, были сконцентрированы до рабочей концентрации приблизительно 20 мг/мл посредством ультрафильтрации через ячейку Amicon UF (Millipore) с мембраной из регенерированной целлюлозы с порогом отсечения по молекулярной массе 5 кДа (Millipore) для мономерного IAVM2e1-HD и мембраной из регенерированной целлюлозы с порогом отсечения по молекулярной массе 10 кДа (Millipore) для димерного IAVM2e1-HD. В концентрированном образце белка был заменен буфер на 10 мМ натрийфосфатный буфер, pH 7,0 путем серийного 4-кратного

промывания (каждое с разбавлением 1/10). Полученные в итоге образцы сохранялись при 4°C.

[00169] Н. Концентрация эндотоксина

[00170] Концентрацию эндотоксина определяли анализом с лизатом амебоцитов мечехвоста (LAL) (Charles River Lab). Восемь 10-кратных разведений белка IAVM2e1-HD и восемь 2-кратных разведений стандарта контрольного эндотоксина были приготовлены с использованием стерильной воды без эндотоксинов. Контрольные образцы и образцы IAVM2e1-HD были аликвотированы в стерильные пробирки 10x75мм без эндотоксинов из боросиликатного стекла и к ним добавляли равный объем (100 мкл) LAL. Помимо этого, 100 мкл LAL добавляли к 100 мкл стерильной воды для инъекций без эндотоксинов в качестве отрицательного контроля. Концентрация эндотоксина (ЕЭ/мл) в образце была рассчитана умножением заявленной чувствительности LAL на обратную величину первого разведения, не давшего свертка.

[00171] О. Чистота и последовательность IAVM2e1-HD

[00172] Чистоту белка оценивали масс-спектрометрией ионного спрея (LC/MS/MS) (Midwest Bio Services). Последовательность белка подтверждали трипсиновым расщеплением IAVM2e1-HD с последующей масс-спектроскопией в ионной ловушке (Midwest Bio Services).

[00173] П. Анализ Вестерн-Блот

[00174] Чтобы удостовериться в том, что очищенный белок был целевым рекомбинантным белком (IAVM2e1-HD), образец очищенного белка (2мкг) снимали 4%-20% ДСН-ПААГ-электрофорезом (Invitrogen). Белки были перенесены на 0,2 мкМ нитроцеллюлозную мембрану (NCM) (BioRad) в буфере Трис-Глицин-Метанол в течение 1,5ч при 100мА. NCM была заблокирована 3% альбумина бычьей сыворотки (АБС) (EMD, PN 2960) в течение 16 часов при 4°C. Для детектирования IAVM2e1-HD, NCM инкубировали с разведением 1:1000 моноклонального антитела против M2e (mAb) (Pierce Кат. № MA1082), разведенного в 1,5% АБС и трис-буферном солевом растворе, содержащем 0,2% Твин-20 pH 7,4 (TTBS). Блот инкубировали со вторичным антителом, козым против мышинового IgG-конъюгированным с пероксидазой хрена (1:7500) в TTBS. Блот выдерживали еще 1 час при покачивании. Блот промывали трижды 20 мл TTBS в течение 15 минут. Затем блот проявляли добавлением 10 мл раствора тетраметилбензидина (ТМВ) (Pierce, Кат. № 34108) и инкубировали 15-30 минут не встряхивая. Реакцию останавливали, осторожно ополаскивая NCM дистиллированной водой.

[00175] Р. Приготовление липосом

[00176] Димиристоилфосфатидилхолин (DMPC, Lipoid), холестерин (Chol, Nippon Oil and Fat), димиристоилфосфатидилглицерин (DMPG, Nippon Fine Chemicals), монофосфориллипид А (МФЛ) были растворены в хлороформе, метаноле (соотношение 1:1), и белок IAVM2e1-ND добавляли до соотношения концентрации липидов и белка, равного 65:1. Поскольку испытываемые образцы имели три разные дозы, то готовили три разных препарата с различными концентрациями. Благодаря этому каждому животному могли дать одинаковый объем дозы. В качестве контроля готовили идентичный образец липидов и МФЛ без белка (L-контроль) (Таблица 2). Липиды и белки были высушены под струей азота. Высушенные липидные пленки выдерживали под вакуумом в течение 48 часов, чтобы удалить остаточные органические растворители. К высушенным липидным пленкам добавляли подходящее количество буферного раствора (натрийфосфатный (10мМ) буферный раствор, 9% сахарозы рН 7,4) до концентрации 0,6, 0,3 или 0,1 мг/мл IAVM2e1-ND. Липидно-белковую смесь нагревали при 60°C в течение ~10 минут, перемешивали на вихревой мешалке 15 секунд, затем подвергали ультразвуковой обработке при мощности 10-20% на ультразвуковом дезинтеграторе Branson в течение 3-5 минут до полупрозрачности, чтобы получить липосомы. В ламинарном шкафу липосомы были подвергнуты стерильной фильтрации через 0,2 мкМ полиэфирсульфоновый шприцевый фильтр в стерильные, апиrogenные пробирки, после чего они были помечены. Препараты липосом передавались из Molecular Express, Inc. д-ру Джилл Адлер-Мур (Dr. Jill Adler-Moore) (Cal Poly Pomona) лично, которая расписывалась в получении липосом. Липосомы транспортировались на льду и сохранялись при 4°C в Cal Poly Pomona. Распределение размеров липосом определяли при помощи Microtrac (Microtrac-UPA150, Ханивелл). Концентрацию белка в каждом липосомном препарате подтверждали ВЭЖХ-анализом.

Таблица 2. Составы L-IAVM2e1-HD

	[Липид] (мг/мл)	[Белок] (мг/мл)	[MPL] (мг/мл)
LDR-IAVM2e1- HD(pET28a)	19,5	0,3	0,3
LDR-IAVM2e1-HD(pEV1)	19,5	0,3	0,3
IAVM2e1(C16S, C18S)- HD	39	0,6	0,3
IAVM2e1(C16S, C18S)- HD	19,5	0,3	0,3
IAVM2e1(C16S, C18S)- HD	6,5	0,1	0,3
IAVM2e(1-15)-HD	39	0,6	0,3
IAVM2e(1-15)-HD	19,5	0,3	0,3
IAVM2e(1-15)-HD)	6,5	0,1	0,3
IAVM2e1(C16S)-HD	39	0,6	0,3
IAVM2e1(C16S)-HD	19,5	0,3	0,3
IAVM2e1(C16S)-HD)	6,5	0,1	0,3
IAVM2e1(C18S)-HD)	39	0,6	0,3
IAVM2e1(C18S)-HD)	19,5	0,3	0,3
IAVM2e1(C18S)-HD)	6,5	0,1	0,3
L-контроль	19,5	0,3	0,3

[00177] С. Модель инфекции вируса гриппа

[00178] Для модели нагрузки гриппом группы (n=17/группа) мышей BALB/c иммунизировали подкожно на 0 неделю и интраназально на 8 неделю вакциной L-IAVM2e1-HD или эквивалентной дозой L-контроля (липосомы со всеми компонентами, кроме белка). Пять из ненагруженных мышей были умерщвлены на 6 сутки и сыворотку собирали для ИФА-анализов (описаны ниже). Остальные двенадцать из иммунизированных мышей были нагружены интраназально (доза 40мкл на нагрузку) на первую неделю после бустинга (неделя 9) с 10 LD50 IAV (H1N1 (A/PR/8/34), выделенного из гомогенатов инфицированного легкого. Для нагрузки вирусом животных вначале анестезировали внутривентриально смесью Кетамина (80 мг/кг) и Ксилазина (16 мг/кг). При помощи наконечника микропипетки на 200 мкл вирус вводили непосредственно в ноздри мышей, позволяя им естественным образом вдохнуть вирус. За семью животными наблюдали в течение 28 дней на предмет признаков заболеваемости (потеря веса, снижение ухода за собой и пониженная активность) и смертности. Пять мышей были умерщвлены на 5 сутки после пробы и их легкие были проанализированы на вирусную нагрузку подсчетом очагов (описано ниже).

[00179] Т. Титры антител и характеристика изотипа при помощи ИФА

[00180] У пяти мышей/группа брали сыворотку на 6 сутки после последней иммунизации. Вкратце, мышей вводили в глубокую седацию внутривентриальным введением смеси Кетамина (120 мг/кг) и Ксилазина (20 мг/кг) и кровь забирали при сердечной пункции. Кровь переносили в микроцентрифужную пробирку, ополоснутую Гепарином. Кровь центрифугировали при 1500 об/мин в течение 20 минут, чтобы отделить сыворотку от клеток крови. Взятую сыворотку аликвотировали и сохраняли при -80°C до использования.

[00181] Сыворотку, взятую у мышей при сердечной пункции, использовали для определения титра изотипа антител против IAVM2e1 анализами OptEIA ELISA (PharMingen, Inc.). Вкратце, для процедуры использовали плоскодонные 96-луночные микротитровальные планшеты Immulon, инкубированные в течение ночи при 4°C со 100мкл/лунка кроющего буферного раствора (65мМ Na₂CO₃, 100мМ NaHCO₃, pH 9,5), содержащего 5мкг/лунка белка IAVM2e1 (UCLA Peptide Synthesis Core Facility). Планшеты были ополоснуты 3X 275мкл промывочного буферного раствора (ФСБ с 0,05% Твин-20) и заблокированы добавлением 275мкл блокирующего буфера (1% фетальной бычьей сыворотки в ФСБ) в каждую лунку с инкубированием планшета при комнатной температуре в течение 2ч. Затем планшет был промыт 7X 275мкл промывочного

буфера/лунка и в каждую лунку помещали по 100мкл разбавленных образцов мышьиной сыворотки (разбавленных блокирующим буфером), после чего планшет инкубировали 2ч при комнатной температуре. За пять минут до окончания 2ч инкубации в блокирующем буферном растворе готовили биотин-меченое антитело детектирования (изотипное антитело против мышьиного иммуноглобулина: против IgG1, против IgG2a, против IgG2b, IgG3, против IgA). Лунки были промыты 7X 275мкл/лунка промывочного буфера и добавляли 100мкл биотинилированного изотипного антитела против мышьиного иммуноглобулина. Планшет запечатывали и инкубировали 1ч при комнатной температуре. Лунки были промыты 7X 275мкл промывочного буфера, буферный раствор при каждом промывании оставляли в лунке на одну минуту до извлечения.

Стрептавидин-пероксидазу хрена, разбавленную блокирующим буфером в соотношении 1:1000, добавляли в каждую лунку (100мкл/лунка) и инкубировали 1ч при комнатной температуре, после чего промывали 7X с 275мкл промывочного буфера. Субстратный реагент (Реагент детектирования пероксидазы) добавляли в каждую лунку (100мкл/лунка) и инкубировали в лунках 40 минут при комнатной температуре в темноте. Стоп-раствор (1М H₃PO₄) добавляли в каждую лунку (100мкл/лунка) и планшеты снимали планшет-ридером SpectraMax на 450нм. Титр антител рассчитывали как обратную величину последнего разбавления сыворотки, дающего ОП выше фонового (лунки, не покрытые IAVM2e1).

[00182] У. Анализ нейтрализации вируса

[00183] Сыворотку иммунизированных мышей разбавляли ФСБ и по 50мкл каждого разбавления сыворотки добавляли к 50мкл разбавления 1:100-1:120 вируса H1N1 в четырех повторностях в 96-луночный круглодонный планшет. Планшет инкубировали в камере с повышенной влажностью при 37°C с 5% CO₂ в течение 8ч. В каждую лунку 24-луночного плоскодонного планшета добавляли по 200 мкл 1x10⁶ клеток Мадин-Дарби почек собак/мл и по 400 мкл разбавленной смеси вирус/сыворотка (объединенный материал из четырех лунок 96-луночного планшета). 24-луночный планшет инкубировали при 37°C с 5% CO₂ в течение 48ч. Затем клетки были зафиксированы 250 мл 100% метанола и инкубированы при комнатной температуре в течение 20 минут. Затем метанол декантировали и клетки окрашивали 10 минут при комнатной температуре с 250 мл 0,1% кристаллического фиолетового в 20% растворе этанола. Клетки ополаскивали дистиллированной водой и высушивали при комнатной температуре. Титр нейтрализации определяли как самое низкое разведение, способное предотвращать цитолиз 50% клеток Мадин-Дарби почек собаки, вызываемый вирусом H1N1. Чтобы определить цитолиз 50%

клеток Мадин-Дарби почек собаки, плотность каждой лунки в планшете рассчитывали при помощи системы UVP Gel DOC.

[00184] Ф. Количественное определение вирусных фокусов *in vitro* (или «бляшек»)

[00185] Чтобы определить титр вируса в легких, легкие пяти мышей в каждой группе были взяты на пятые сутки после нагрузки, гомогенизированы, и были изготовлены серийные десятикратные разбавления гомогенизатов легких на льду в СМЕМ (МЕМ, 10% ФСБ и 1% пенициллина-стрептомицина). Аликвоту 200 мкл образца легкого смешивали с 200 мкл клеток Мадин-Дарби почки собаки ($7 \times 10^5 - 1 \times 10^6$ клеток/мл) в 24-луночных планшетах и инкубировали при 37°C, 5% CO₂, чтобы клетки Мадин-Дарби почки собаки прилипли ко дну планшетов. Спустя 6ч, в каждую лунку добавляли по 300 мкл 3% метилцеллюлозы, разбавленной СМЕМ. Планшеты инкубировались 40-48 ч в инкубаторе при 37°C, 5% CO₂. Чтобы сделать видимым образование вирусных фокусов, проводили процедуру иммуногистохимического окрашивания. 3% метилцеллюлозу удаляли и планшеты промывали 1X ФСБ. Затем в каждую лунку добавляли по 400мкл 4% формальдегида в ФСБ, чтобы зафиксировать клетки. Планшеты были инкубированы 30 минут при комнатной температуре, фиксаж удаляли и клетки пермеабилizировали 400 мкл на лунку 0,5% Тритона X-100 в ФСБ. Планшеты были промыты 2X ФСБ, а затем инкубированы с 10% раствором ФБС в ФСБ в течение 90 минут при комнатной температуре. После инкубирования планшеты были промыты 1X ФСБ и в добавляли по 150 мкл на лунку моноклонального антитела против NP-гриппа (разбавление 1:100 в ФСБ). После инкубирования в течение 90 минут при комнатной температуре, планшеты были промыты 7X ФСБ и в каждую лунку добавляли по 150 мкл анти-IgG, меченных пероксидазой хрена (разбавление 1:1000 в ФСБ, 10%ФБС). Планшеты были инкубированы 90 минут, промыты 7X ФСБ, после чего добавляли по 300 мкл проявляющего субстрата (25,7 мл Na₂HPO₄ (0,1M), смешивали с 24,3 мл лимонной кислоты (0,05 M) и 20 мг диаминобензидина и 20 мкл H₂O₂). Планшеты инкубировали 10-30 минут, реакцию останавливали путем промывания планшетов дистиллированной водой. Число фокусообразующих единиц (а именно, число локализованных областей окрашенных коричневым цветом клеток в каждой лунке) подсчитывали при помощи инвертирующего микроскопа. Количество фокусов в каждой лунке умножали на фактор разбавления и использовали для определения количества образующих фокус или «бляшку» единиц/мл.

[00186] X. Статистический анализ.

[00187] Для статистического анализа применяли дисперсионный анализ рядов, критерии суммы рангов Каплана-Майера и Манна-Уитни или критерий Уилкоксона. Конкретный(е) анализ(ы) выбирали в зависимости от анализируемых данных/образца.

[00188] Пример 2. Результаты

[00189] В этом исследовании нами были сконструированы четыре новые конструкции IAVM2e1-HD в дополнение к pET28a-IAVM2e1-HD; (i) pEV1 IAVM2e1-HD с LDR-последовательностью, описанной выше, (ii) pEV1-IAVM2e1(C16S,C18S)-HD (iii) pEV1-IAVM2e1(C16S)-HD, (iv) pEV1-IAVM2e1(C18S)-HD и (v) pEV1-IAVM2e1(1-15)-HD. Все новые плазмиды были секвенированы и было подтверждено, что они находятся в рамке считывания и содержат правильную последовательность. ПЦР-продукты для каждой конструкции IAVM2e1-HD свидетельствуют о том, что каждый из ПЦР-продуктов соответствует ожидаемому размеру соответствующей вставки IAVM2e1-HD. Плазмиды были трансформированы в штамм *E. coli* C-43, после чего они были экспрессированы. Для подтверждения того, что конструкции экспрессируют белок, были выполнены маломасштабные исследования экспрессии. В отличие от оригинальной конструкции pET28a-IAVM2e1-HD, pEV-содержащие конструкции IAVM2e1-HD показывали высокие уровни экспрессии белка, по сравнению с соответствующими неиндуцированными контролями. Чтобы удостовериться в экспрессии целевого белка M2e, выполняли анализ вестерн-блот. Белки IAVM2e1 развивались с моноклональным антителом против M2e. Напротив, отрицательный контроль Защитный Антиген *B. anthracis* не был обнаружен, как ожидалось. В нескольких образцах IAVM2e1 наблюдались множественные линии, что свидетельствует о том, что даже в присутствии додецилсульфата натрия и β -меркаптоэтанола, IAVM2e1-HD может образовывать мультимеры.

[00190] Мембранные фракции были далее переработаны и затем подвергнуты аффинной очистке Ni-NTA. Фракции слитого белка тиоредоксин-IAVM2e1-HD были элюированы 20 mM трис, 250 mM имидазола, pH 8. Фракции были исследованы способом ДСН-ПААГ-электрофореза, и фракции, содержащие целевой белок, были объединены и дополнительно очищены. Подобным образом выполняли переработку различных рекомбинантных слитых белков тиоредоксин-IAVM2e1-HD и очистку различных пептидов IAVM2e1-HD. Очистка пептида IAVM2e1(1-15)-HD описана более подробно здесь в качестве репрезентативного набора данных. Образцы аффинно очищенных на Ni-NTA слитых белков в элюирующем буферном растворе (20 mM трис, 250 mM имидазола, pH 8), были проанализированы ВЭЖХ, чтобы оценить содержание белка. На репрезентативной ВЭЖХ-хроматограмме образца слитого белка тиоредоксин-IAVM2e1(1-15)-HD присутствовали два основных компонента, элюирующихся приблизительно на 9 и

12 минутах; большой пик фронта растворителя (3 мин) содержал, в основном, остаточный имидазол и более полярные компоненты. Компонент на 9 минуте был основной примесью с кажущейся молекулярной массой приблизительно 17 кДа (данные не показаны). Компонентом на 12 минуте являлся целевой слитый белок тиоредоксин-IAVM2e1(1-15)-HD.

[00191] Чтобы сконцентрировать образцы и понизить уровень примесных малых молекул, таких как имидазол и/или иные компоненты, аффинно очищенные на Ni-NTA образцы слитого белка были подвергнуты ультрафильтрации со сменой буферного раствора в 10 мМ натрий-фосфатном буферном растворе, pH 8. Ультрафильтрацию выполняли с использованием ультрафильтрационной ячейки с перемешиванием Amicon, емкостью 50 мл, с мембраной с порогом отсечения по молекулярной массе 50 кДа PES. Обычно выполняли 4 или более циклов ультрафильтрации, как описано выше, что приводило к 10000-кратному или большему разбавлению элюирующего буферного раствора и его компонентов. Проточные (объединенные) и концентратные фракции от процесса ультрафильтрации были проанализированы ВЭЖХ. По этому способу более крупная часть примесного компонента на 9 мин. может быть удалена. В концентратной фракции сохранялась более крупная часть слитого белка на 12 мин. Процесс ультрафильтрации обладает преимуществом ранее наблюдаемого, но неисследованного явления, при котором низкомолекулярные HD-белки могут удерживаться мембраной с высоким порогом отсечения по молекулярной массе. В этом случае мономерный слитый белок ~24,0 кДа может быть удержан мембраной PES с порогом отсечения 50 кДа, в то время, как другие компоненты, включая примесь ~17 кДа, проходят через нее. Предполагается, что -HD-компонент белка объединяется в стабильные мультисубъединичные комплексы или агрегаты крупнее 50 кДа, что позволяет -HD-белкам удерживаться в концентратной фракции.

[00192] Слитый белок был впоследствии расщеплен TEV-протеазой, чтобы отсоединить тиоредоксиновый компонент от пептида IAVM2e1(1-15)-HD при помощи 5 единиц TEV протеазы на 1 мг слитого белка в течение более чем 18 ч при 25°C, в присутствии 0,5 мМ ЭДТА, 10 мМ β-меркаптоэтанола. После расщепления слитого белка TEV-протеазой для получения тиоредоксинового и IAVM2e(1-15)-HD компонентов, образец был подвергнут ультрафильтрации в ячейке с перемешиванием Amicon через мембрану PES с порогом отсечения 50 кДа для частичного снижения уровня тиоредоксиновых компонентов. В ультрафильтрованном образце уровень тиоредоксинового компонента на 8-9 мин был снижен более чем на 85% с почти 100% удержанием остаточного слитого белка на 11-12 мин и IAVM2e1(1-15)-HD на 14 мин.

[00193] Концентрат после процесса ультрафильтрации, содержащий предполагаемый IAVM2e1(1-15)-HD и существенно пониженные уровнем тиоредоксиновые компоненты, был разбавлен до приблизительно 10 мг IAVM2e1(1-15)-HD на мл 10 мМ натрия фосфата, рН 8, а затем подвергнут препаративной ОФ-ВЭЖХ для очистки IAVM2e1(1-15)-HD от оставшихся примесных компонентов. 2 мл образца, содержащие приблизительно 20 мг IAVM2e1(1-15)-HD были инжектированы в препаративную колонку C18 (22x250 мм) и элюированы ацетонитрильным градиентом, содержащим 0,1% трифторуксусной кислоты. По этому способу элюируются остаточные тиоредоксиновые компоненты между 30-35 мин и нерасщепленный слитый белок между 35-40 мин. Фракции на 40-42 мин обычно собирались как пептиды IAVM2e1(1-15)-HD. По способу эффективно отделялись тиоредоксин и компоненты слитого белка от предполагаемого компонента IAVM2e1(1-15)-HD, который, как ожидалось, высокочистый.

[00194] Различные рекомбинантные слитые белки IAVM2e1-HD перерабатывались аналогично. Образцы, расщепленные TEV-протеазой, подвергались препаративной ВЭЖХ, и мономерные формы пептидов извлекались аналогично. Фракции, содержащие различные ВЭЖХ-очищенные IAVM2e1-HD пептиды, анализировались ВЭЖХ, чтобы оценить чистоту. Аналитические ВЭЖХ-хроматограммы показывают, что относительно чистые пептиды IAVM2e1-HD, элюирующиеся между 11 и 15 мин, извлекались из препаративных ВЭЖХ-фракций без детектируемых уровней любых иных примесных белковых компонентов, включая тиоредоксин и слитый белок.

[00195] Пептиды IAVM2e1(1-15)-HD и IAVM2e1(C16S,C18S)-HD были сконструированы без остатков цистеина и поэтому не будут способны формировать связанные дисульфидом димеры или мультимеры. Как таковые, эти пептиды извлекались в виде мономеров в ультрафильтрационной ячейке с перемешиванием Amicon через мембрану из регенерированной целлюлозы с порогом отсечения по молекулярной массе 5 кДа, чтобы удержать и обменять буферный раствор с растворителя ацетонитрил/трифторуксусная кислота на 10 мМ натрия фосфат, рН 8.

[00196] Пептиды IAVM2e1(C16S)-HD и IAVM2e1(C18S)-HD были сконструированы содержащими по одному цистеину и, таким образом, были способны образовывать димеры. В этих пептидах буферный раствор был обменян на 10 мМ натрия фосфата рН 8, а затем их окисляли при комнатной температуре в присутствии воздуха в течение более 72 часов. После окисления димеры были отделены от оставшихся мономеров препаративной ВЭЖХ. Димеры обычно элюировались приблизительно на 2-3 минуты позже мономеров, благодаря чему отдельные фракции были собраны в виде очищенных димеров. В димерных фракциях буферный раствор был обменян ультрафильтрацией в ячейке с

перемешиванием через мембрану из регенерированной целлюлозы с порогом отсечения по молекулярной массе 5 кДа. После того, как буферный раствор заменялся на 10 мМ натрия фосфат, pH 8, димеры легко осаждались. Итоговые образцы были обменены и восстановлены в 80% этаноле, который лучше растворял димерные пептиды.

[00197] Пептид LDR-6His-IAVM2e1-HD (из вектора pEV) был сконструирован так, чтобы походить на pET28a-полученный пептид IAVM2e1-HD. Обычно пептиды pET28a-IAVM2e1-HD выделяли, а затем их лиофилизировали и восстанавливали в буферном растворе при pH 8. Вследствие наличия 2 цистеинов, наблюдалось, что пептиды pET28a-IAVM2e1-HD с легкостью принимают димерные и мультимерные формы в качестве преобладающих молекулярных видов. Поэтому очищенные мономеры LDR-6His-IAVM2e1-HD перерабатывались аналогично, чтобы сымитировать образование димеров и мультимеров. ВЭЖХ-очищенные мономеры LDR-6His-IAVM2e1-HD были ультрафильтрованы, чтобы заменить буферный раствор на 10 мМ натрия фосфат, pH 8, затем лиофилизированы и восстановлены водой с поддержанием буферной емкости на 10 мМ натрия фосфата, pH 8. ВЭЖХ-анализ восстановленного LDR-6His-IAVM2e1-HD выявил существенное окисление мономеров в другие виды.

[00198] Очищенные пептиды IAVM2e1-HD, восстановленные в натрий-фосфатном буферном растворе или 80% этаноле, были проанализированы ДСН-ПААГ-электрофорезом в невозстановительных условиях (в отсутствие β -меркаптоэтанола, чтобы избежать восстановления дисульфидно связанных мультимеров в мономеры), чтобы оценить миграционные паттерны пептидов. Рассчитанные молекулярные массы для каждого пептида показаны в Таблице 3, колонке 3.

Таблица 3. Свойства очищенных белков IAVM2e1-HD. NaPi (натрия фосфат). Масс-спектрометрия ЭСИ-МС. Расчетная масса исходя из усредненного изотопа. Уровень эндотоксинов по LAL анализу.

Пептидная Конструкция	Восстановительный раствор	Расчетная масса (а.е.м.)	Измеренная масса (а.е.м.)	Эндотоксины (ЕЭ / 15 мкг)
IAVM2e1(1-15)-HD	10 mM NaPi pH 8	6923	6925	6,9
IAVM2e1(C16S,C18S)- HD	10 mM NaPi pH 8	7986	7988	0,12
IAVM2e1(C16S)-HD	80% Этанол	16002 (димер)	16002	0,052
IAVM2e1(C18S)-HD	80% Этанол	16002 (димер)	16004	0,050
LDR-6His-IAVM2e1- HD	10 mM NaPi pH 8	10312 (мономер) 20623 (димер)	10314 20627	0,20

[00199]

[00200] Пептид IAVM2e1(1-15)-HD, который, как ожидалось, мономерен, элюируется одиночной линией с кажущейся молекулярной массой приблизительно 5 кДа, что согласуется с расчетным размером мономерного вида в 6,9 кДа. Пептид IAVM2e1(C16S,C18S)-HD, который, как ожидалось, мономерен, элюируется одиночной линией с кажущейся молекулярной массой приблизительно 6 кДа, что согласуется с расчетным размером мономерного вида в 8,0 кДа. Пептиды IAVM2e1(C16S)-HD и IAVM2e1(C18S)-HD, как ожидалось, димерны, элюируются одиночными линиями между маркерами 14 и 22 кДа, что согласуется с расчетным размером димерного вида в 16 кДа. При восстановлении этих образцов наблюдались одиночные линии, мигрирующие к маркеру 6 кДа, что соответствует мономерным формам. Для пептида LDR-6His-IAVM2e1-HD, который, как ожидалось, содержит множество форм, наблюдается пять отдельных линий в невозстанавливающих условиях. При восстановлении образца наблюдается только 2 отдельные линии, основная выше маркера 6 кДа, что соответствует мономерной форме 10,3 кДа, а также меньшая линия – чуть выше маркера 14 кДа. Меньшая линия выше маркера 14 кДа, вероятно, соответствует пренебрежимым уровням примесного тиоредоксинового компонента. Линии приблизительно на 20, 30 и 40 кДа соответствуют молекулярному размеру димеров, тримеров и тетрамеров, соответственно. Исходя из паттерна миграции на Фигуре 6, полосе 4, пептид LDR-6His-IAVM2e1-HD в этом препарате находится преимущественно в мономерной и димерной формах. В общем, ДСН-ПААГ-электрофорез выявил относительно чистые пептиды IAVM2e1-HD правильной молекулярной массы.

[00201] Чтобы подтвердить массу пептидов IAVM2e1-HD, образцы были подвергнуты ЭХ-ЭСИ-МС. Результаты представлены в Таблице 3, колонках 3 и 4. В общем, масс-спектрометрические данные подтвердили, что измеренная масса очищенных пептидов совпадала с расчетной массой различных пептидов IAVM2e1-HD, свидетельствуя о том, что были восстановлены нужные пептиды IAVM2e1-HD.

[00202] Для подтверждения того, что процесс очистки может удалить эндотоксин до пренебрежимых уровней, в различных образцах IAVM2e1-HD были определены количественно уровни эндотоксинов при помощи LAL-анализа. Результаты представлены в Таблице 3, колонке 5, в ЕЭ/15 мкг белка (предполагаемое количество белка на дозу в последующих исследованиях на животных). В среднем, уровни эндотоксина в различных образцах были пренебрежимы, в образце IAVM2e1(1-15)-HD наблюдались наивысшие уровни в 6,9 ЕЭ/15 мкг.

[00203] Поскольку для испытаний новых конструкций использовалось большое число мышей, были выполнены два отдельных испытания различных составов L-IAVM2e1-HD.

В каждой группе в качестве положительных контролей использовались оригинальный L-LDR-IAVM2e1-HD (pET28a), L-LDR-IAVM2e1-HD (pEV1, представляет собой идентичный с pET28a версией белок, но от высокоэкспрессирующей плазмиды) и L-контроль в качестве отрицательного контроля. В первой группе содержались L-IAVM2e1(C16S, C18S)-HD и L-IAVM2e1(1-15)-HD, каждый из которых, как прогнозировалось, образует мономерные формы белка IAVM2e1-HD.

[00204] Распределение размеров варьировалось в каждом из разных липосомных композиций. В целом, наблюдались бимодальные распределения липосом с одним пиком в интервале от 41,8 нм до 84,5 нм и вторым пиком в интервале от 189,9 нм до 298,2 нм. Напротив, в препарате L-LDR-IAVM2e1-HD (pEV1) наблюдалось унимодальное распределение на 188 нм (Таблица 4). Бимодальное распределение размеров в образцах липосомных белков может быть обусловлено внутримембранным передвижением IAVM2e1-HD на водной поверхности при измерении UPA. В отличие от этого, для L-контроля, не содержащего белка, наблюдалось унимодальное распределение по Гауссу на 57,8 нм.

Таблица 4. Первое исследование составов L-IAVM2e1-HD на мышах

	Ожидаем ое [белок] (мг/мл)	ВЭЖХ [белок] (мг/мл)	Распределение размеров	
			Пик №1 нм / %	Пик №2 нм / %
L-LDR-IAVM2e1- HD(pET28a)	0,3	ND	68,4 / 80	212,0 / 20
L-LDR-IAVM2e1-HD(pEV1)	0,3	ND	188,8 / 100	
L-IAVM2e1(C16S, C18S)- HD	0,6	0,504	84,5 / 56	298,2 / 44
L-IAVM2e1(C16S, C18S)- HD	0,3	0,276	60,5 / 67	189,8 / 33
L-IAVM2e1(C16S, C18S)- HD	0,1	0,086	73,5 / 48	204,9 / 52
L-IAVM2e1(1-15)-HD	0,6	0,541	70,1 / 48	226,6 / 52
L-IAVM2e1(1-15)-HD	0,3	0,230	59,8 / 54	241,9 / 46
L-IAVM2e1(1-15)-HD	0,1	0,102	41,8 / 65	213,3 / 35
L-контроль	NA	NA	57,8 / 100	

NA- Не применимо

ND- Не выполнено

[00205] Концентрацию белка определяли для каждого из препаратов L-IAVM2e1(C16S, C18S)-HD и L-IAVM2e1(1-15)-HD. ОФ-ВЭЖХ анализ концентрации белка показал, что образцы содержали 80-100% от первичного исходного материала. Потеря белка может быть связана с приставанием белка к стенкам пробирок, потерям при ультразвуковой обработке зондом и потерям при стерильной фильтрации. По причине мультимерности формы конструкции IAVM2e1-HD из pET28 и pEV и нехватки разрешающей способности, концентрации белка не определялись.

[00206] Во второй группе содержалось две серии с одиночными мутациями (а именно, пептиды C16S и C18S IAVM2e), которые, как предсказывалось, продуцируют димерную форму белка. Липосомы образовывали типичный полупрозрачный раствор с переменными распределениями размеров. Аналогично мономерным конструкциям IAVM2e1-HD в первой группе, имелись некоторые препараты с унимодальным

распределением и некоторые препараты с бимодальным распределением (Таблица 5). Вариабельность этого распределения не коррелировала с типом белка или концентрацией белка. Как правило, первый пик лежал в интервале от 48 нм до 173 нм, а второй пик - от 149 нм до 254 нм. Концентрацию белка в итоговом липосомном препарате определяли при помощи ОФ-ВЭЖХ. Данные показывают, что при приготовлении этих образцов было потеряно очень небольшое количество белка (Таблица 5).

Таблица 5. Второе исследование составов L-IAVM2e1-HD на мышах

	Ожидаемое [белок] (мг/мл)	ВЭЖХ [белок] (мг/мл)	Распределение размеров	
			Пик №1 нм / %	Пик №2 нм / %
L-LDR-IAVM2e1-HD(pET28a)	0,3	ND	67,9 / 100	
L-LDR-IAVM2e1-HD(pEV1)	0,3	ND	173,7 / 100	
L-IAVM2e1(C16S)-HD	0,6	0,57	83,8 / 100	
L-IAVM2e1(C16S)-HD	0,3	0,30	58,8 / 58	191,5 / 42
L-IAVM2e1(C16S)-HD	0,1	0,094	66,1 / 79	254,2 / 21
L-IAVM2e1(C18S)-HD	0,6	0,54	83,8 / 100	
L-IAVM2e1(C18S)-HD	0,3	0,28	84,3 / 100	
L-IAVM2e1(C18S)-HD	0,1	0,10	48,3 / 57	149,1 / 43
L-контроль	NA	NA	67,0 / 100	

NA- Не применимо

ND- Не выполнено

[00207] Ранее нами было показано, что вакцина L-IAVM2e1-HD может индуцировать выраженный защитный иммунный ответ у мышей против летальной нагрузки вирусом гриппа [Ernst et al., 2006]. Этот ответ был связан с гуморальным иммунным ответом, поскольку сыворотка L-IAVM2e1-HD-иммунизированных мышей может защищать наивных мышей от летальной нагрузки гриппом. Из-за общего количества мышей, которые использовались для испытаний новых конструкций, были выполнены два отдельных испытания. В первом исследовании производилась иммунизация мышей BALB/c так, как описано в разделе «материалы и способы» оригинальными L-LDR-IAVM2e1-HD (pET28a), L-LDR-IAVM2e1-HD (pEV; это белок, идентичный версии pET28a, но от плазмиды с высокой экспрессией), L-IAVM2e1(1-15)-HD и L-IAVM2e1(C16S, C18S)-HD. В этом эксперименте обрезанный (IAVM2e1-15) и двойной мутантный IAVM2e1(C16S, C18S) белки сравнивались с оригинальным белком IAVM2e1. У мышей, которые были иммунизированы 15 мкг оригинального состава (из pET28a) и оригинального состава (из pEV), наблюдалась хорошая иммунная защитная реакция с 72%-й выживаемостью. При иммунизации мышей 5 мкг, 15 мкг или 30 мкг L-IAVM2e1(1-15)-HD, 86% мышей выживали при летальной нагрузке гриппом ($p < 0,05$ в сравнении с L-контролем). Все из мышей, получавших L-контроль с последующей нагрузкой, погибли к 9 суткам (Фигура 7А). Помимо этого, у иммунизированных мышей наблюдались минимальные признаки заболевания и снижение веса в сравнении с группой, получавшей контроль. В отличие от мышей, иммунизированных L-IAVM2e1(1-15)-HD, среди мышей, иммунизированных 5 мкг, 15 мкг или 30 мкг L-IAVM2e1(C16S, C18S)-HD, только у мышей, получивших дозу 30 мкг, наблюдались значимые различия с контрольными ($p = 0,006$, выживаемость 86%). У мышей, получавших 5 мкг или 15 мкг L-IAVM2e1(C16S, C18S)-HD, выживаемость составляла только 57% и 42%, соответственно (Фигура 8А). Мыши также оценивались на потерю массы тела и признаки заболевания, которые коррелировали с процентной выживаемостью.

[00208] Во втором исследовании мыши были иммунизированы мутантами IAVM2e1 с одним цистеином (C16S или C18S) в виде липосомного препарата. Эти мутанты образовывали димерные формы IAVM2e1-HD и сравнивались *in vivo* с мономерными формами IAVM2e1-HD, описанными выше. Группы мышей были иммунизированы 5 мкг, 15 мкг или 30 мкг L-IAVM2e1(C16S)-HD и затем нагружались 10 ЛД50 A/PR/8/34. Для испытанных трех доз иммунная защитная реакция варьировалась. У мышей, иммунизированных дозами по 5 мкг, 15 мкг или 30 мкг, выживаемость составляла 86%, 71% и 57%, соответственно. Только для доз 5 мкг ($p = 0,004$) и 15 мкг ($p = 0,032$)

наблюдались существенные различия с L-контролем, при использовании которого все мыши, получавшие L-контроль, погибли к 9 суткам после нагрузки. У мышей, получавших по 5 мкг, 15 мкг или 30 мкг L-IAVM2e1(C18S)-HD наблюдался гораздо лучший ответ, нежели у мышей, получавших C16S-мутанта. Выжили все из мышей, получивших дозу 15 мкг при летальной нагрузке, и все, кроме одной из семи мышей (86%), получивших дозу 5 мкг и 30 мкг. Каждая из этих доз оказывала значительно лучший эффект, чем наблюдавшийся у мышей, получавших L-контроль ($p < 0,005$). Любопытно, что обе конструкции с одиночными мутациями на цистеин оказывали лучшую профилактику, чем немутантные вакцины L-LDRIAVM2e1-HD. Помимо этого, у иммунизированных мышей наблюдались минимальные признаки заболевания и снижение веса в сравнении с группой, получавшей контроль.

[00209] Пример 3. Выводы

[00210] Поскольку в сегменте IAVM2e1 содержится два цистеина (в положениях 16 и 18; см. Таблицу 2), и пептид может образовывать дисульфидную связь с образованием димеров и мультимеров, очистка белка IAVM2e1-HD затруднительна. Поскольку белок экспрессируется в различных формах, степень очистки ниже, чем хотелось бы. При экспрессировании и очистке IAVM2e1-HD с только одним цистеином или без цистеинов, по настоящему изобретению получается более однородная молекула белка. Наши данные показывают, что при мутациях IAVM2e1-HD с одним цистеином образовывались димеры и при экспрессии с тиоредоксином получались количества белка, сравнимые с оригинальным IAVM2e1-HD. Чтобы испытать мономерные формы IAVM2e1-HD, были изготовлены две дополнительные конструкции. Была сделана одна конструкция, в которой оба цистеина были мутированы, и вторая конструкция, в которой использовались только первые 15 остатков IAVM2e1. В обоих случаях белок образовывался в виде мономера и экспрессировался одинаково хорошо в случае оригинальной формы и мутантной формы с одиночным цистеином. Эти данные свидетельствуют о том, что остатки цистеина играют определяющую роль в структуре белка при димеризации и мультимеризации белка в окислительной среде (например, в буферных растворах, используемых при изготовлении липосом). Очистка мономерных форм белка не вызывала затруднений и обеспечивала высокую степень чистоты. Помимо этого, было ясно, что не было разницы в экспрессии белков IAVM2e1-HD, когда эти белки были слиты с C-концом тиоредоксина.

[00211] Доклинические результаты, описанные здесь, свидетельствуют о том, что антигенный сегмент IAVM2e1 является возможным кандидатом для универсальной вакцины против гриппа. Хотя между различными формами использовавшегося пептида

наблюдались различия, почти все конструкции стимулировали существенный защитный иммунный ответ с по меньшей мере одной дозой в сравнении с контрольными.

Неожиданным было то, что, как видно из этих данных, остатки цистеина не играют роли в защитном иммунном ответе, поскольку и двойной цистеиновый мутант, и обрезанный белок IAVM2e1(1-15) стимулировали защитный иммунный ответ.

[00212] Пример 4. Литература

[00213] Ernst WA, Kim HJ, Tumpey TM, et al. Protection against H1, H5, H6 and H9 influenza A infection with liposomal matrix 2 epitope vaccines. *Vaccine* 2006;24(24):5158-68.

[00214] Fan J, Liang X, Horton MS, et al. Preclinical study of influenza virus A M2 peptide conjugate vaccines in mice, ferrets, and rhesus monkeys. *Vaccine* 2004;22(23-24):2993-3003.

[00215] Liu W, Li H, Chen YH. N-terminus of M2 protein could induce antibodies with inhibitory activity against influenza virus replication. *FEMS Immunol.Med Microbiol.* 2003;35(2):141-6.

[00216] Neiryck S, Deroo T, Saelens X, Vanlandschoot P, Jou WM, Fiers W. A universal influenza A vaccine based on the extracellular domain of the M2 protein. *Nat.Med* 1999;5(10):1157-63.

[00217] Пример 5. HSV2

[00218] Чтобы продемонстрировать эффективность белковой вакцины HSV2, согласно Примеру 1, был изготовлен липосомный состав, содержащий подходящий антиген HSV, с полипептидом, содержащим, а предпочтительно, состоящим из одной или более следующих последовательностей HSV2 вместо IAVM2e1:

HTDLHPNNTY, RSSLGSLLY, YMESVFQMY, FLVDAIVRVA, FLIAYQPLL,
FLWEDQTLL, ILIEGIFFA, RILGVLVHL, SVYPYDEFV, EYQRLYATF, KYFYCNSLF,
LYPDAPPLRL, ALATVTLKY, ALLAKMLFY, LLAYVSVLY, SIVHHHAQY,
SSGVVFGTWY, VYMSPFYGY, YMANQILRY, YVAGFLALY, CPRRPAVAF, и
VVRGPTVSL (SEQ ID NOS: 60-81)

[00219] Чтобы показать пригодность HSV2 вакцины для стимуляции защитных иммунных реакций у людей, в качестве животной модели использовались мыши, трансгенные по человеческому HLA A2:01 (Tg) (n=20/группа). Из пяти гаплотипов HLA, представленных в этой вакцине, HLA A2:01 является наилучшей моделью, поскольку этот гаплотип HLA является наиболее частым гаплотипом HLA во всех этнических группах людей. Аналогично описанному выше, липосомные композиции последовательности(ей) HSV2, слитые с подходящим гидрофобным доменом, как описано здесь, приготавливались в адьюванте MPL или CpG. У вакцинированных мышей (N=20/группа)

изучался ответ на каждый из пептидов HSV2 посредством мультигранульного Luminex анализа ELISA и ELISPOT (5 мышей/группа), затем мышей нагружали интравагинально для определения степени защиты, в соответствии с процедурами, описанными выше.

[00220] Специалист в данной области техники с легкостью поймет, что настоящее изобретение хорошо адаптировано для достижения целей и упомянутых, а также неотъемлемых конечных точек и преимуществ. Примеры, представленные здесь, отображают предпочтительные варианты воплощения и являются примерными, и не подразумевается, что они ограничивают объем изобретения.

[00221] Хотя изобретение было описано и представлено в примерах достаточно детально, для того, чтобы специалисты в данной области техники осуществили и использовали его, в изобретение могут быть внесены различные изменения, модификации и улучшения, которые, как очевидно, не отступают от объема изобретения. Примеры, представленные здесь, отображают предпочтительные варианты воплощения и являются примерными, и не подразумевается, что они ограничивают объем изобретения.

Модификации в нем и другие виды использования будут понятны специалистам в данной области техники. Эти модификации охватываются сущностью изобретения и устанавливаются объемом формулы изобретения.

[00222] Специалисту в данной области техники будет очевидно, что в изобретение, раскрытое здесь, могут быть внесены различные изменения и замены без отступления от сущности и объема изобретения.

[00223] Все патенты и публикации, упомянутые в спецификации, показывают уровень знаний специалистов в области техники, к которой относится данное изобретение. Все патенты и публикации включены сюда посредством ссылки до такой же степени, как если бы для каждой отдельной публикации было специально и отдельно указано, что она включена посредством ссылки.

[00224] Изобретение, иллюстративно описанное здесь, может подходящим образом использоваться в отсутствие какого-либо элемента или элементов, ограничение или ограничения на которые не раскрыто специальным образом здесь. Таким образом, к примеру, в каждом случае здесь любой из терминов «включающий», «состоящий в основном из» и «состоящий из» может быть заменен любым из двух других терминов. Используемые термины и выражения применяются в качестве описательных терминов, а не ограничительных, и не подразумевается, что при использовании таких терминов и выражений исключаются любые эквиваленты показанных и описанных элементов или их частей, но предполагается, что возможны различные модификации, охватываемые заявленной формулой изобретения. Таким образом, следует понимать, что хотя настоящее

изобретение было конкретным образом раскрыто в предпочтительных вариантах воплощения и необязательных элементах, специалисты в данной области техники могут прибегнуть к модифицированию и варьированию концепций, раскрытых здесь, и такие модификации и вариации считаются входящими в объем этого изобретения, как определено прилагаемой формулой изобретения.

[00225] Другие варианты воплощения определены представленной ниже формулой изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Композиция, содержащая:

водный носитель; и

липосомы, содержащие:

(i) димиристоилфосфатидилхолин («DMPC»),

(ii) димиристоилфосфатидилглицерин («DMPG»), димиристоилтриметиламмоний-пропан («DMTAP»), либо DMPG и DMTAP вместе,

(iii) по меньшей мере один стерин; и

iv) первую полипептидную последовательность, содержащую T-клеточную антигенную последовательность, а также

вторую полипептидную последовательность, содержащую трансмембранную

последовательность природного гетерологичного мембранного белка, либо

происходящую от него, причем в указанной второй полипептидной последовательности

имеется количество остатков, достаточное для пересечения липидного бислоя, по

меньшей мере девять последовательных остатков из которых по прогнозу образуют

альфа-спираль с показателем гидрофобности приблизительно 0,7 или выше,

причем указанная антигенная полипептидная последовательность прямо или

опосредованно связана с N- или C- концом указанной второй полипептидной

последовательности с получением водорастворимого слитого белка, и в которой

антигенная полипептидная последовательность слитого белка представлена на внешней

поверхности липосом.

2. Композиция, содержащая:

водный носитель; и

липосомы, содержащие:

димиристоилфосфатидилхолин («DMPC»),

димиристоилфосфатидилглицерин («DMPG»), димиристоилтриметиламмоний-пропан («DMTAP»), либо DMPG и DMTAP вместе,

по меньшей мере один стерин; и

антигенный полипептид, содержащий

первую полипептидную последовательность, содержащую по меньшей мере 10

последовательных остатков внеклеточного домена M2 гриппа А, последовательность

которого была модифицирована так, чтобы удалить один или более остатков цистеина,

естественным образом встречающихся в указанном внеклеточном домене M2, и

вторую полипептидную последовательность, гетерологичную по отношению к М2 гриппа А, содержащую трансмембранную последовательность мембранного белка, вторую полипептидную последовательность, содержащую трансмембранную последовательность встречающегося в природе мембранного белка, гетерологичного по отношению к М2 гриппа А, либо происходящую от него, причем в указанной второй полипептидной последовательности имеется количество остатков, достаточное для пересечения липидного бислоя, по меньшей мере девять последовательных остатков из которых по прогнозу образуют альфа-спираль с показателем гидрофобности приблизительно 0,7 или выше, причем указанная первая полипептидная последовательность прямо или опосредованно связана с N- или С- концом указанной второй полипептидной последовательности с получением водорастворимого слитого белка, и в которой первая полипептидная последовательность слитого полипептида представлена на внешней поверхности липосом.

3. Композиция по п. 1 или 2, отличающаяся тем, что относительные процентные содержания DMPC, DMPG/DMTAP и стерина составляют от 50% до 98% DMPC : от 1% до 25% DMPG/DMTAP : от 1% до 25% стерина.
4. Композиция по п. 1 или 2, отличающаяся тем, что относительные процентные содержания DMPC, DMPG/DMTAP и стерина составляют от 70% до 98% DMPC : от 1% до 15% DMPG/DMTAP : от 1% до 15% стерина.
5. Композиция по п. 1 или 2, отличающаяся тем, что относительные процентные содержания DMPC, DMPG/DMTAP и стерина составляют от 70% до 85% DMPC : от 5% до 15% DMPG/DMTAP : от 10% до 15% стерина.
6. Композиция по п. 1 или 2, отличающаяся тем, что относительные процентные содержания DMPC, DMPG/DMTAP и стерина составляют приблизительно 75% DMPC, приблизительно 10% DMPG/DMTAP и приблизительно 15% стерина.
7. Композиция по любому из пп. 1-6, отличающаяся тем, что липосомы содержат DMPG.
8. Композиция по п. 7, отличающаяся тем, что липосомы не содержат DMTAP.

9. Композиция по любому из пп. 1-8, отличающаяся тем, что дополнительно содержит один или более дополнительных компонентов, выбранных из группы, состоящей из пептидогликана, липопептида, липополисахарида, монофосфориллипида А, липотейхоевой кислоты, резиквимода, имиквимода, флагеллина, олигонуклеотидов, содержащих неметилованные CpG-мотивы, α -галактозилцерамида, мурамилдипептида, полностью транс-ретиноевой кислоты, двухцепочечной вирусной РНК, белков теплового шока, диоктадецилдиметиламмония бромид, катионных поверхностно-активных веществ, агонистов toll-подобного рецептора, димиристоилтриметиламмонийпропана и агонистов nod-подобного рецептора.
10. Композиция по одному из пп. 1-9, отличающаяся тем, что композиция содержит стерин, который выбран из группы, состоящей из холестерина, холестерина хлороформата, стигмастерина, ситостерина, эргостерина, ланостерина, десмостерина и кампестерина.
11. Композиция по одному из пп. 1-10, отличающаяся тем, что первая полипептидная последовательность содержит по меньшей мере 10 последовательных остатков из остатков 2 – 22 одной из SEQ ID NOS: 1-9.
12. Композиция по одному из пп. 1-10, отличающаяся тем, что первая полипептидная последовательность содержит по меньшей мере 10 последовательных остатков из одной из SEQ ID NOS: 10-12.
13. Композиция по одному из пп. 1-12, отличающаяся тем, что один или более остатков цистеина удалены из последовательности внеклеточного домена M2 гриппа А посредством мутации интересующего(их) остатка(ов) цистеина на другой остаток, либо обрезанием последовательности внеклеточного домена до интересующего(их) остатка(ов) цистеина.
14. Композиция по одному из пп. 1-10, отличающаяся тем, что первая полипептидная последовательность содержит по меньшей мере 10 последовательных остатков из одной из SEQ ID NOS: 13-15.
15. Композиция по одному из пп. 1-10, отличающаяся тем, что первая полипептидная последовательность содержит SEQ ID NO: 16.

16. Композиция по одному из пп. 1-15, отличающаяся тем, что вторая полипептидная последовательность содержит трансмембранную последовательность, закодированную белком, выбранным из группы, состоящей из Цитохрома b5, Муцина-4 бета цепи, рецептора трансферрина, TNFRSF13B, Аминопептидазы N, Дипептидилпептидазы 4, факторсинтаксина некроза опухолей 3, VclXL и R9AP.
17. Композиция по одному из пп. 1-15, отличающаяся тем, что вторая полипептидная последовательность содержит по меньшей мере 10 последовательных остатков из одной из SEQ ID NOS: 17-25.
18. Композиция по п. 17, отличающаяся тем, что вторая полипептидная последовательность содержит трансмембранную последовательность, закодированную белком Цитохрома b5.
19. Композиция по п. 16, отличающаяся тем, что вторая полипептидная последовательность содержит трансмембранную последовательность, закодированную одной из SEQ ID NOS: 26-42.
20. Композиция по одному из пп. 1, 3-10 или 16, отличающаяся тем, что первая полипептидная последовательность содержит одну или более последовательностей, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NOS: 60-81.
21. Способ иммунизации животного, включающий:
введение композиции по одному из пп. 1-20 парентеральным путем упомянутому животному.
22. Способ приготовления липосомной композиции по п. 1 или 2, включающий:
рекомбинантное экспрессирование или синтез химическими способами антигенного полипептида, при этом антигенный полипептид находится в мономерной форме в неденатурирующих условиях;
очистку антигенного полипептида в водном растворе;
добавление водного раствора, содержащего антигенный полипептид, к липидной смеси, содержащей (i) DMPC, (ii) DMPG, DMTAP или DMPG и DMTAP и (iii) по меньшей мере, один стерин;

высушивание антигенного полипептида и липидной смеси; и
обработку ультразвуком высушенного антигенного полипептида и липидной смеси в
присутствии водного носителя с образованием липосом.

23. Выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует слитый белок, последовательность которого содержит:
последовательность первой нуклеиновой кислоты, кодирующую тиоредоксин;
последовательность второй нуклеиновой кислоты, кодирующую интересующую полипептидную последовательность; и
последовательность третьей нуклеиновой кислоты, кодирующую трансмембранную последовательность природного гетерологичного мембранного белка, либо происходящую от него, причем в указанной второй полипептидной последовательности имеется количество остатков, достаточное для пересечения липидного бислоя, по меньшей мере девять последовательных остатков из которых по прогнозу образуют альфа-спираль с показателем гидрофобности приблизительно 0,7 или выше, при этом указанная последовательность нуклеиновой кислоты сконфигурирована так, что при экспрессии нуклеиновой кислоты тиоредоксин экспрессируется N-терминально к трансмембранной последовательности.
24. Выделенная нуклеиновокислотная последовательность по п. 23, отличающаяся тем, что дополнительно содержит последовательности контроля экспрессии, функционально связанные с нуклеиновокислотной последовательностью, кодирующей слитый белок.
25. Выделенная нуклеиновокислотная последовательность по п. 23 или 24, отличающаяся тем, что дополнительно содержит одну или более дополнительных нуклеиновокислотных последовательностей, кодирующих маркер аффинности.
26. Выделенная нуклеиновокислотная последовательность по одному из пп. 23-25, отличающаяся тем, что дополнительно содержит одну или более дополнительных нуклеиновокислотных последовательностей, кодирующих сайт протеазного расщепления.
27. Выделенная нуклеиновокислотная последовательность по одному из пп. 23-26, отличающаяся тем, что по меньшей мере часть последовательности выделенной нуклеиновой кислоты кодон-оптимизирована для экспрессии в клетке-хозяине.

28. Выделенная нуклеиновокислотная последовательность по п. 27, отличающаяся тем, что по меньшей мере часть последовательности выделенной нуклеиновой кислоты кодон-оптимизирована для экспрессии в *E. coli*.
29. Выделенная нуклеиновокислотная последовательность по одному из пп. 23-28, отличающаяся тем, что вторая нуклеиновокислотная последовательность кодирует антигенную последовательность, полипептид-нацеленный лиганд или фузогенную полипептидную последовательность.
30. Композиция по одному из пп. 23-29, отличающаяся тем, что третья нуклеиновокислотная последовательность кодирует трансмембранную последовательность, закодированную белком, выбранным из группы, состоящей из Цитохрома b5, Муцина-4 бета цепи, рецептора трансферрина, TNFRSF13B, Аминопептидазы N, Дипептидилпептидазы 4, факторсинтаксина некроза опухолей 3, VclXL и R9AP.
31. Композиция по одному из пп. 23-29, отличающаяся тем, что третья нуклеиновокислотная последовательность содержит по меньшей мере 10 последовательных остатков из одной из SEQ ID NOS: 17-25.
32. Композиция по п. 30, отличающаяся тем, что третья нуклеиновокислотная последовательность содержит трансмембранную последовательность, закодированную белком Цитохрома b5.
33. Композиция по п. 30, отличающаяся тем, что третья нуклеиновокислотная последовательность содержит трансмембранную последовательность, закодированную одной из SEQ ID NOS: 26-42.
34. Клетка-хозяин, отличающаяся тем, что трансформирована выделенной нуклеиновокислотной последовательностью по одному из пп. 23-33.
35. Способ получения интересующей полипептидной последовательности, включающий:
экспрессирование слитого белка, закодированного выделенной нуклеиновокислотной последовательностью из клетки-хозяина по п. 34.

36. Способ по п. 35, отличающийся тем, что дополнительно содержит очистку всего или части экспрессируемого слитого белка в водном растворе.

37. Способ по п. 36, отличающийся тем, что дополнительно содержит добавление водного раствора, содержащего очищенный белок, к липидной смеси, содержащей (i) DMPC, (ii) DMPG, DMТАР или и DMPG и DMТАР и (iii) по меньшей мере один стерин; высушивание очищенного белка и липидной смеси; и обработку ультразвуком высушенного очищенного белка и липидной смеси в присутствии водного носителя с образованием липосом.

Фиг. 1

Последовательность: *Homo sapiens*

 10 20 30 40
 NKPPETLIIT IDSSSSWWTN WVIPAI³⁰SAV⁴⁰ VALMYRLYMA ED

ДЛИНА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: 42

Индивидуальные величины для 20 аминокислот по шкале гидрофобности / Eisenberg et al. составляют:

Ala:	0.620	Arg:	-2.530	Asn:	-0.780	Asp:	-0.900	Cys:	0.290
Gln:	-0.850								
Glu:	-0.740	Gly:	0.480	His:	-0.400	Ile:	1.380	Leu:	1.060
Lys:	-1.500								
Met:	0.640	Phe:	1.190	Pro:	0.120	Ser:	-0.180	Thr:	-0.050
Trp:	0.810								
Tyr:	0.260	Val:	1.080	:	-0.840	:	-0.795	:	-0.000

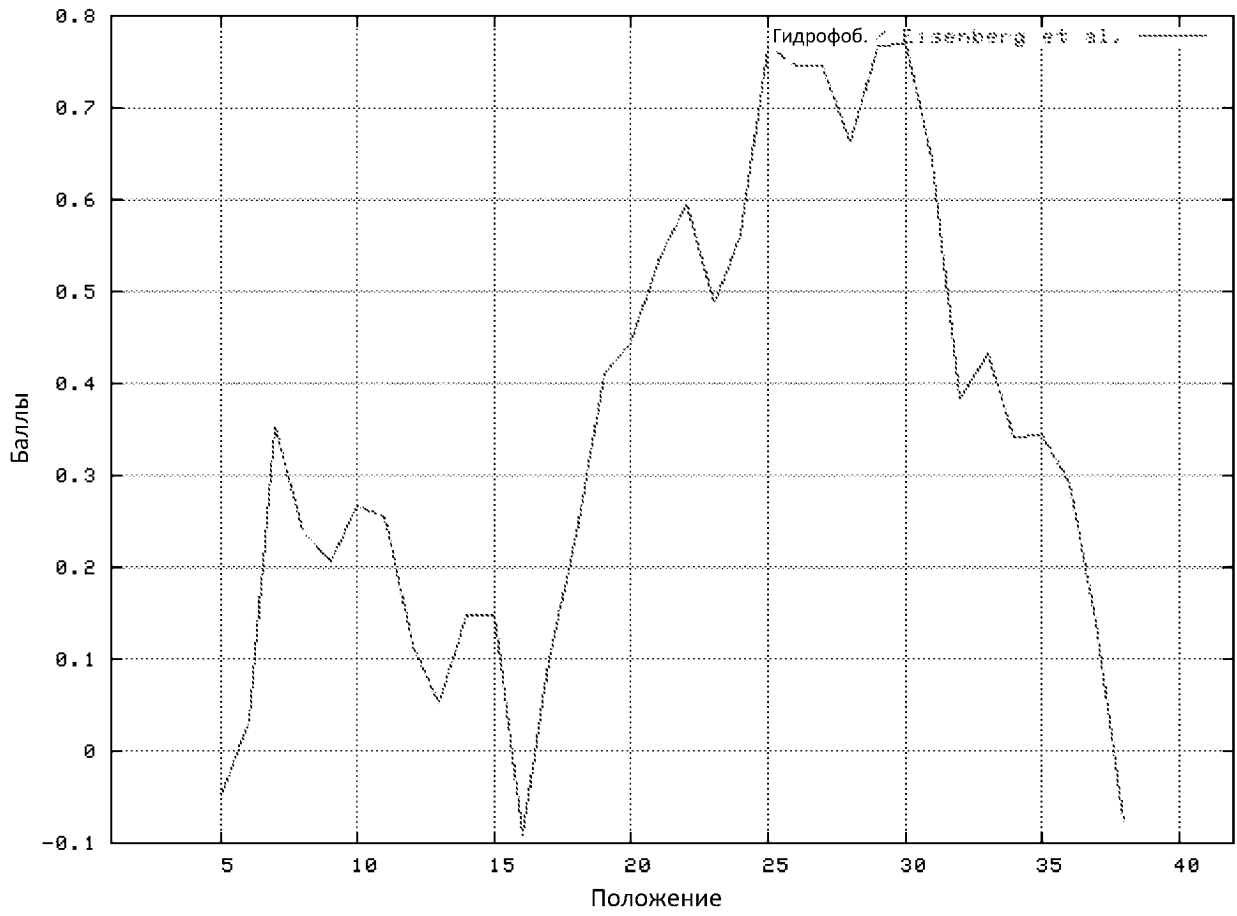
Веса для положений окон 1,..,9, используя модель линейной вариации веса:

1	2	3	4	5	6	7	8	9
1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
край				центр				край

МИН : -0.092
 МАКС : 0.769

Фиг. 1
(окончание)

Результаты Protoscale для пользовательской последовательности



Фиг. 2

Последовательность: Ratus

10
20
30
40

AKPSETLITT VESNSSWWTN WVIPAISALV VALMYRLYMA ED

ДЛИНА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: 42

.....

Индивидуальные величины для 20 аминокислот по шкале гидрофобности / Eisenberg et al. составляют:

Ala:	0.620	Arg:	-2.530	Asn:	-0.780	Asp:	-0.900	Cys:	0.290
Gln:	-0.850								
Glu:	-0.740	Gly:	0.480	His:	-0.400	Ile:	1.380	Leu:	1.060
Lys:	-1.500								
Met:	0.640	Phe:	1.190	Pro:	0.120	Ser:	-0.180	Thr:	-0.050
Trp:	0.810								
Tyr:	0.260	Val:	1.080	:	-0.840	:	-0.795	:	-0.000

.....

Веса для положений окон 1,..,9, используя модель линейной вариации веса:

1	2	3	4	5	6	7	8	9
1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
край				центр				край

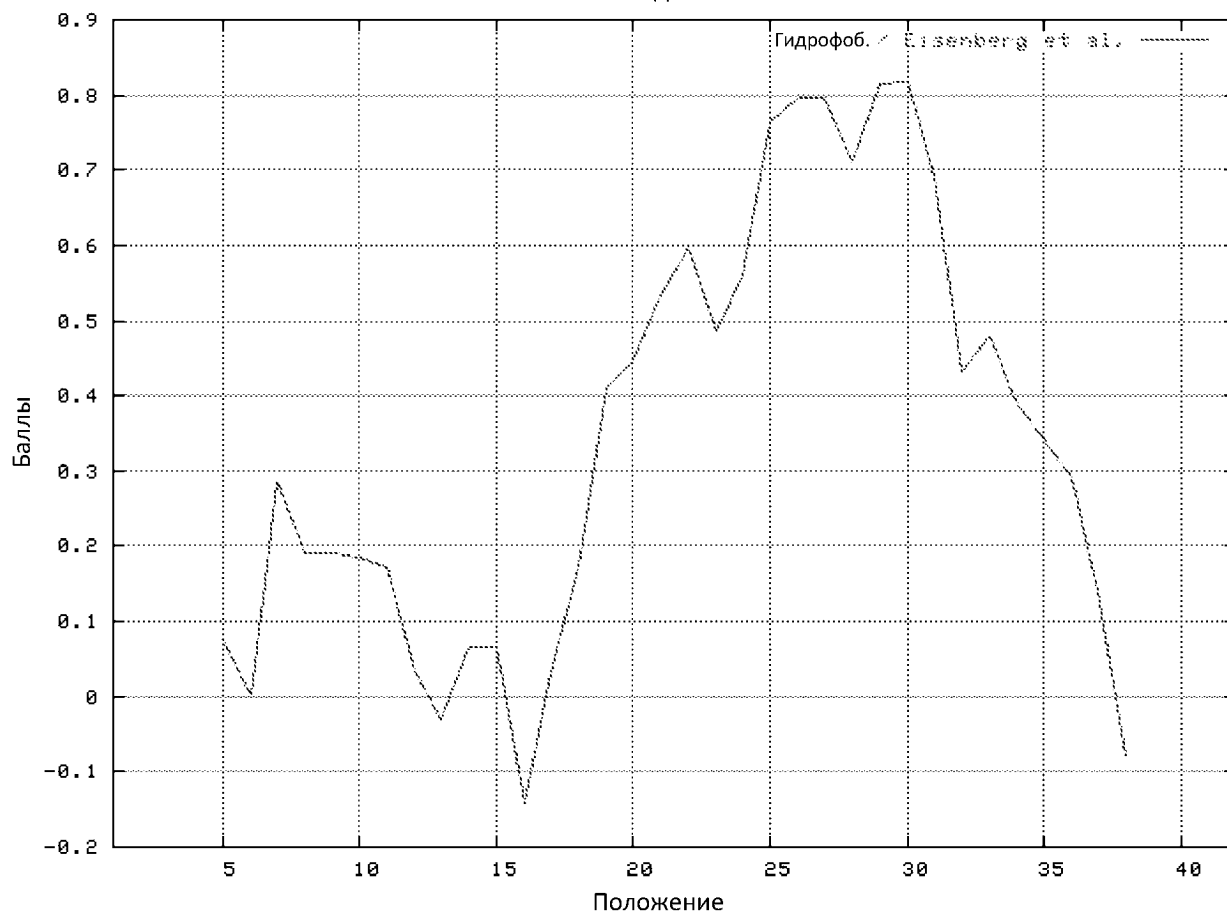
.....

МИН : -0.141

МАКС : 0.818

Фиг. 2
(окончание)

Результаты Protoscale для пользовательской последовательности



Фиг. 3

Последовательность: **Mus musculus**

10
20
30
40
 AKPSDTLITT VESNSSWWTN WVIP AISALÄ VALMYRLYMA ED

ДЛИНА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: 42

.....
 Индивидуальные величины для 20 аминокислот по шкале гидрофобности / Eisenberg et al.
 составляют:

Ala:	0.620	Arg:	-2.530	Asn:	-0.780	Asp:	-0.900	Cys:	0.290
Gln:	-0.850								
Glu:	-0.740	Gly:	0.480	His:	-0.400	Ile:	1.380	Leu:	1.060
Lys:	-1.500								
Met:	0.640	Phe:	1.190	Pro:	0.120	Ser:	-0.180	Thr:	-0.050
Trp:	0.810								
Tyr:	0.260	Val:	1.080	:	-0.840	:	-0.795	:	-0.000

.....
 Веса для положений окон 1,..,9, используя модель линейной вариации веса:

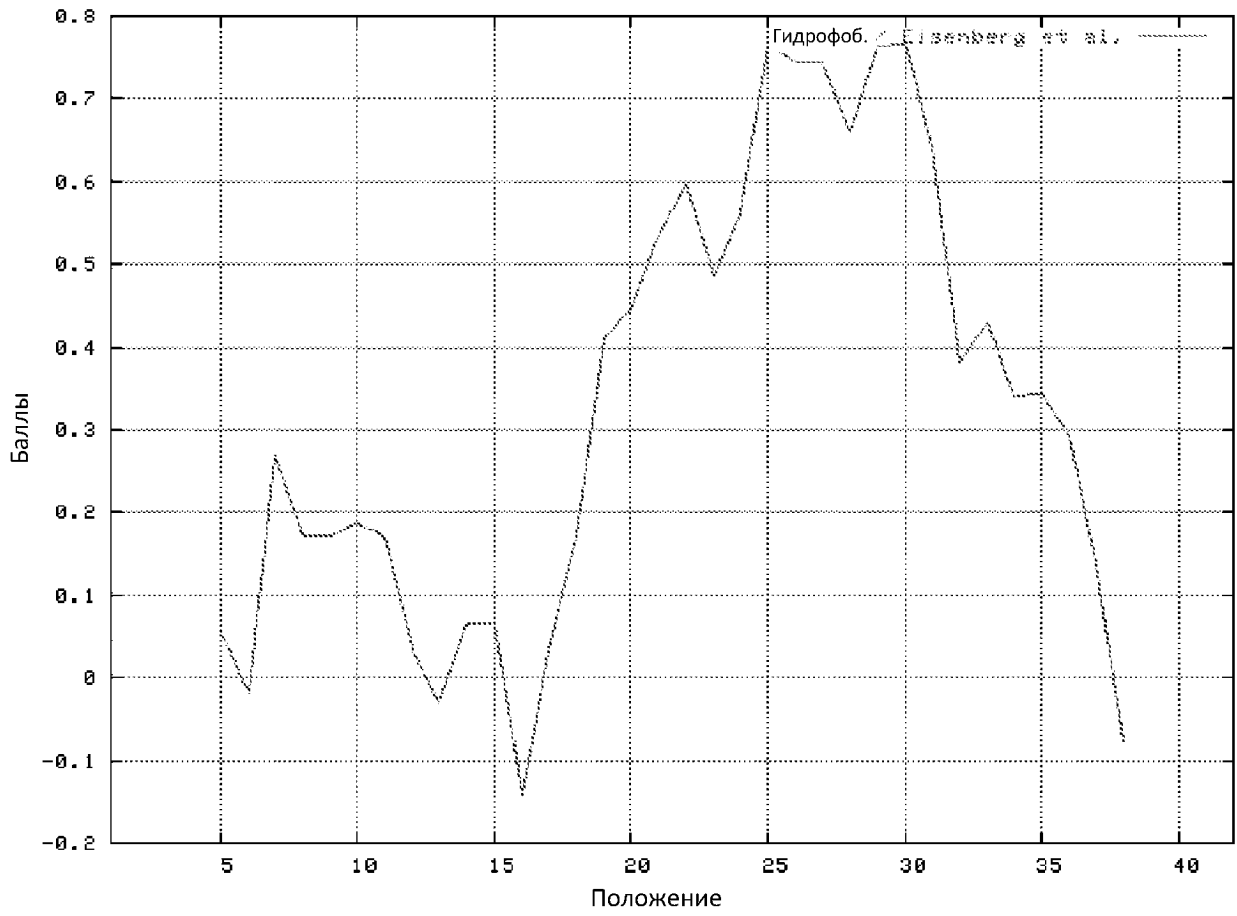
1	2	3	4	5	6	7	8	9
1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
край				центр				край

МИН : -0.141

МАКС : 0.767

Фиг. 3
(окончание)

Результаты Protoscale для пользовательской последовательности



Фиг. 4

Последовательность: **Oryctolagus cuniculus**

 10 20 30 40
SKPMETLITT VDSNSSWWTN WVIPAISALI VALMYRLYMA DD

ДЛИНА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: 42

Индивидуальные величины для 20 аминокислот по шкале гидрофобности / Eisenberg et al.
составляют:

Ala:	0.620	Arg:	-2.530	Asn:	-0.780	Asp:	-0.900	Cys:	0.290
Gln:	-0.850								
Glu:	-0.740	Gly:	0.480	His:	-0.400	Ile:	1.380	Leu:	1.060
Lys:	-1.500								
Met:	0.640	Phe:	1.190	Pro:	0.120	Ser:	-0.180	Thr:	-0.050
Trp:	0.810								
Tyr:	0.260	Val:	1.080	:	-0.840	:	-0.795	:	-0.000

Веса для положений окон 1,..,9, используя модель линейной вариации веса:

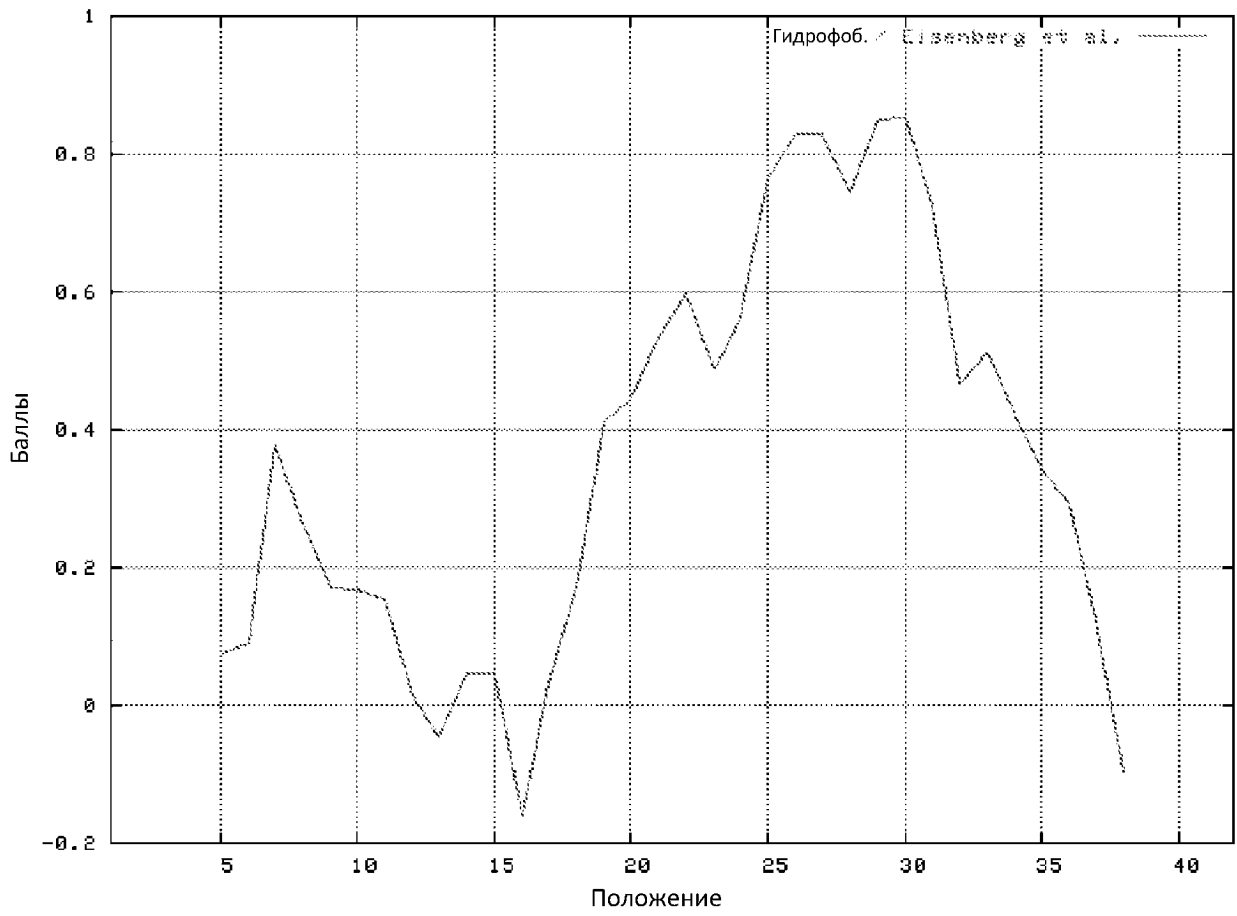
1	2	3	4	5	6	7	8	9
1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
край				центр				край

МИН : -0.159

МАКС : 0.851

Фиг. 4
(окончание)

Результаты Protscale для пользовательской последовательности



Фиг. 5

Последовательность: *Gallus gallus*

10
20
30
40
 QKPAETLITT VQSNSSSWSN WVIPAIAAII VALMYRSYMS E

ДЛИНА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: 41

.....

Индивидуальные величины для 20 аминокислот по шкале гидрофобности / Eisenberg et al. составляют:

Ala:	0.620	Arg:	-2.530	Asn:	-0.780	Asp:	-0.900	Cys:	0.290
Gln:	-0.850								
Glu:	-0.740	Gly:	0.480	His:	-0.400	Ile:	1.380	Leu:	1.060
Lys:	-1.500								
Met:	0.640	Phe:	1.190	Pro:	0.120	Ser:	-0.180	Thr:	-0.050
Trp:	0.810								
Tyr:	0.260	Val:	1.080	:	-0.840	:	-0.795	:	-0.000

.....

Веса для положений окон 1,...,9, используя модель линейной вариации веса:

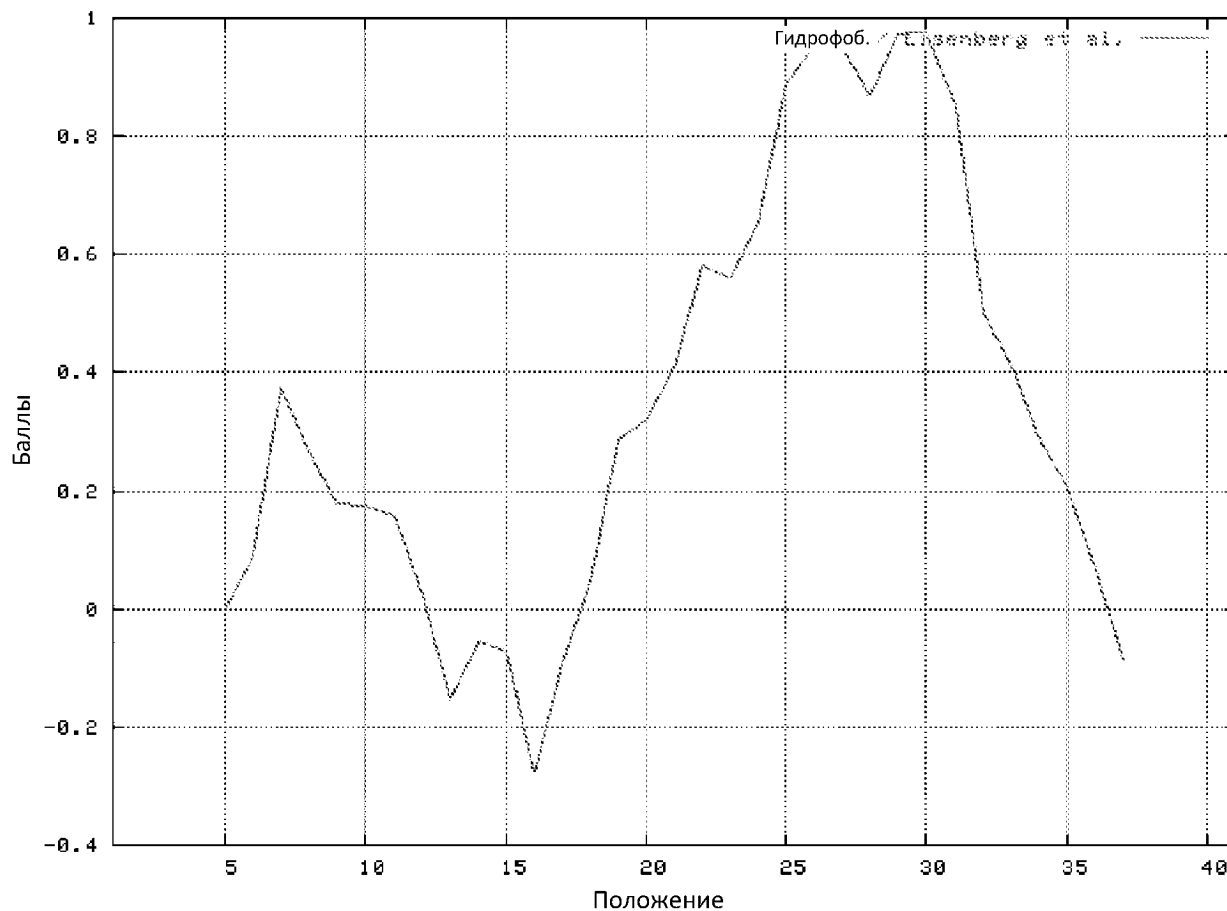
1	2	3	4	5	6	7	8	9
1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
край				центр				край

.....

МИН : -0.278
 МАКС : 0.976

Фиг. 5
(окончание)

Результаты Protoscale для пользовательской последовательности



Фиг. 6

Последовательность: Sus scrofa

10 20 30 40
 АКРSETLITТ VESNSSWWTN WVIP AISALV VSLMYHFYTS EN

ДЛИНА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: 42

Индивидуальные величины для 20 аминокислот по шкале гидрофобности / Eisenberg et al. составляют:

Ala:	0.620	Arg:	-2.530	Asn:	-0.780	Asp:	-0.900	Cys:	0.290
Gln:	-0.850								
Glu:	-0.740	Gly:	0.480	His:	-0.400	Ile:	1.380	Leu:	1.060
Lys:	-1.500								
Met:	0.640	Phe:	1.190	Pro:	0.120	Ser:	-0.180	Thr:	-0.050
Trp:	0.810								
Tyr:	0.260	Val:	1.080	:	-0.840	:	-0.795	:	-0.000

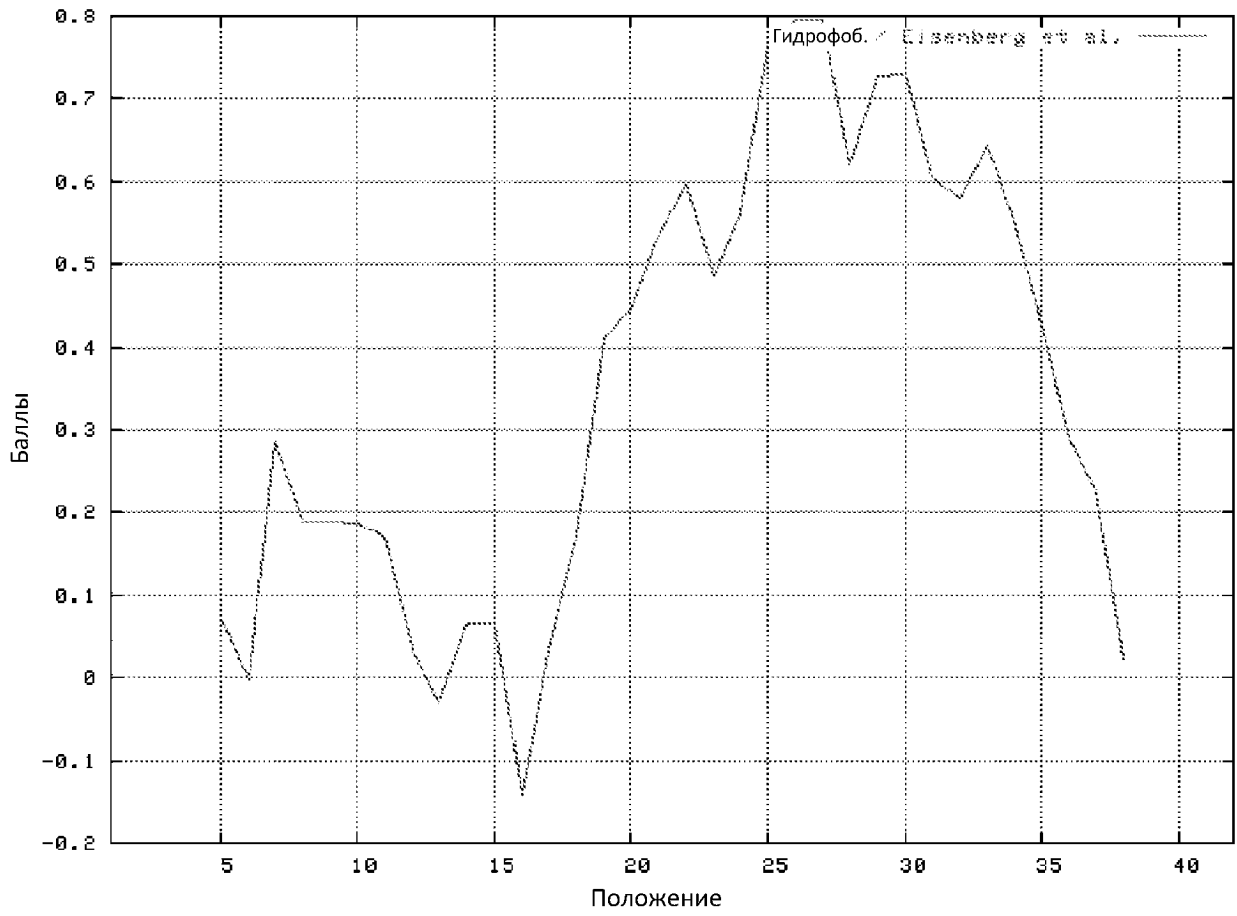
Веса для положений окон 1,...,9, используя модель линейной вариации веса:

1	2	3	4	5	6	7	8	9
1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
край				центр				край

МИН : -0.141
 МАКС : 0.796

Фиг. 6
(окончание)

Результаты Protoscale для пользовательской последовательности



Фиг. 7

Последовательность: Xenopus

10
20
30
40
 QKPSEFITT TDS¹⁰SSW²⁰SN WIIPGISAM³⁰I VALMYRFY⁴⁰ MV SE

ДЛИНА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: 42

.....

Индивидуальные величины для 20 аминокислот по шкале гидрофобности / Eisenberg et al. составляют:

Ala:	0.620	Arg:	-2.530	Asn:	-0.780	Asp:	-0.900	Cys:	0.290
Gln:	-0.850								
Glu:	-0.740	Gly:	0.480	His:	-0.400	Ile:	1.380	Leu:	1.060
Lys:	-1.500								
Met:	0.640	Phe:	1.190	Pro:	0.120	Ser:	-0.180	Thr:	-0.050
Trp:	0.810								
Tyr:	0.260	Val:	1.080	:	-0.840	:	-0.795	:	-0.000

.....

Веса для положений окон 1,..,9, используя модель линейной вариации веса:

1	2	3	4	5	6	7	8	9
1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
край				центр				край

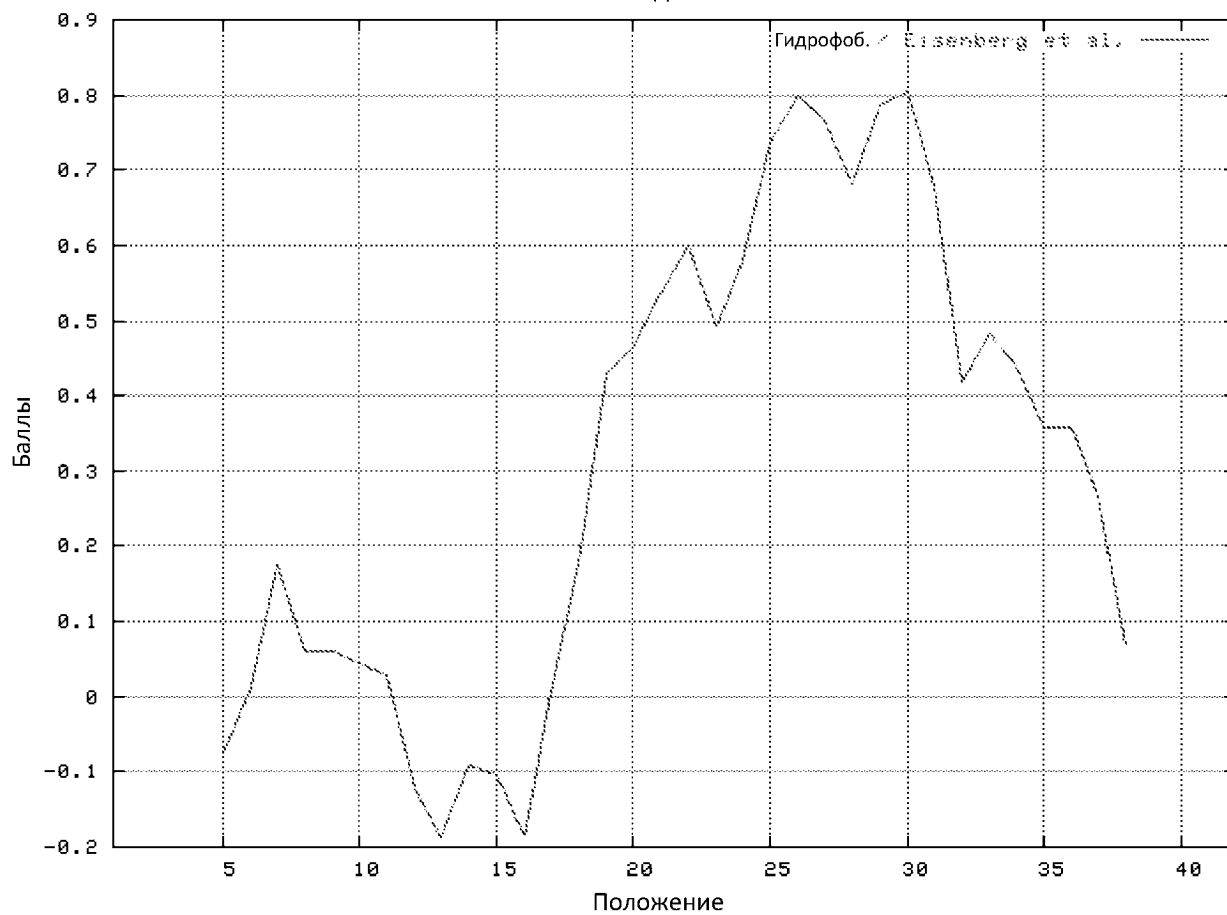
.....

МИН : -0.187

МАКС : 0.804

Фиг. 7
(окончание)

Результаты Protoscale для пользовательской последовательности



Фиг. 8

Последовательность: *Bombus mori*

10
20
30
40
 QYSWEDTAKT SETEASFVNS WKFPVLLGLA LTL~~LY~~SYIFG

ДЛИНА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: 40

.....

Индивидуальные величины для 20 аминокислот по шкале гидрофобности / Eisenberg et al. составляют:

Ala:	0.620	Arg:	-2.530	Asn:	-0.780	Asp:	-0.900	Cys:	0.290
Gln:	-0.850								
Glu:	-0.740	Gly:	0.480	His:	-0.400	Ile:	1.380	Leu:	1.060
Lys:	-1.500								
Met:	0.640	Phe:	1.190	Pro:	0.120	Ser:	-0.180	Thr:	-0.050
Trp:	0.810								
Tyr:	0.260	Val:	1.080	:	-0.840	:	-0.795	:	-0.000

.....

Веса для положений окон 1,..,9, используя модель линейной вариации веса:

1	2	3	4	5	6	7	8	9
1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
край				центр				край

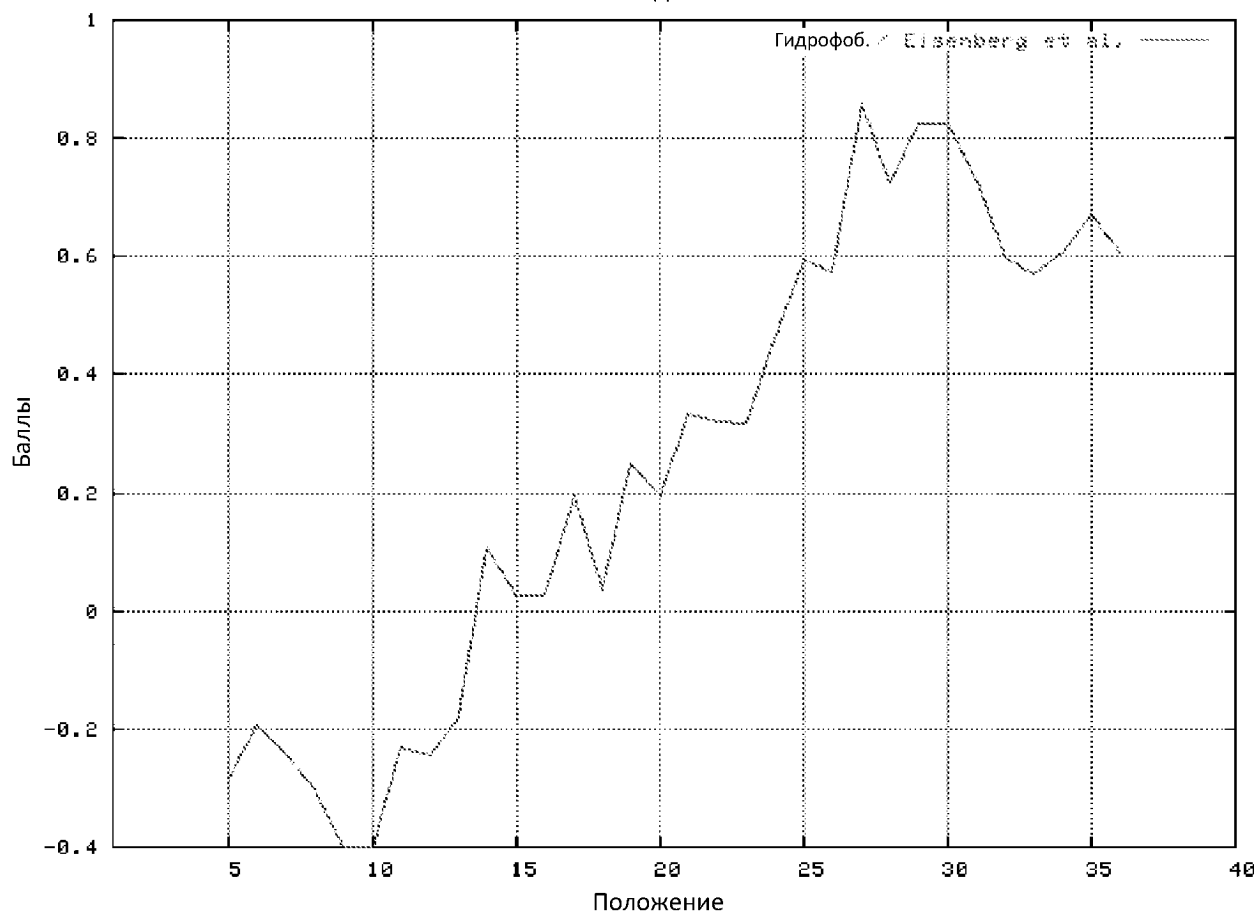
.....

МИН : -0.399

МАКС : 0.859

Фиг. 8
(окончание)

Результаты Protoscale для пользовательской последовательности



Фиг. 9

Последовательность: *Olea europaea* Олива европейская

 10 20 30 40
 KQPHYNQDKT SDFIIKLLQF LVPLFILGVA VGINFYTKSS A

ДЛИНА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: 41

.....
 Индивидуальные величины для 20 аминокислот по шкале гидрофобности / Eisenberg et al.
 составляют:

Ala:	0.620	Arg:	-2.530	Asn:	-0.780	Asp:	-0.900	Cys:	0.290
Gln:	-0.850								
Glu:	-0.740	Gly:	0.480	His:	-0.400	Ile:	1.380	Leu:	1.060
Lys:	-1.500								
Met:	0.640	Phe:	1.190	Pro:	0.120	Ser:	-0.180	Thr:	-0.050
Trp:	0.810								
Tyr:	0.260	Val:	1.080	:	-0.840	:	-0.795	:	-0.000

.....
 Веса для положений окон 1,..,9, используя модель линейной вариации веса:

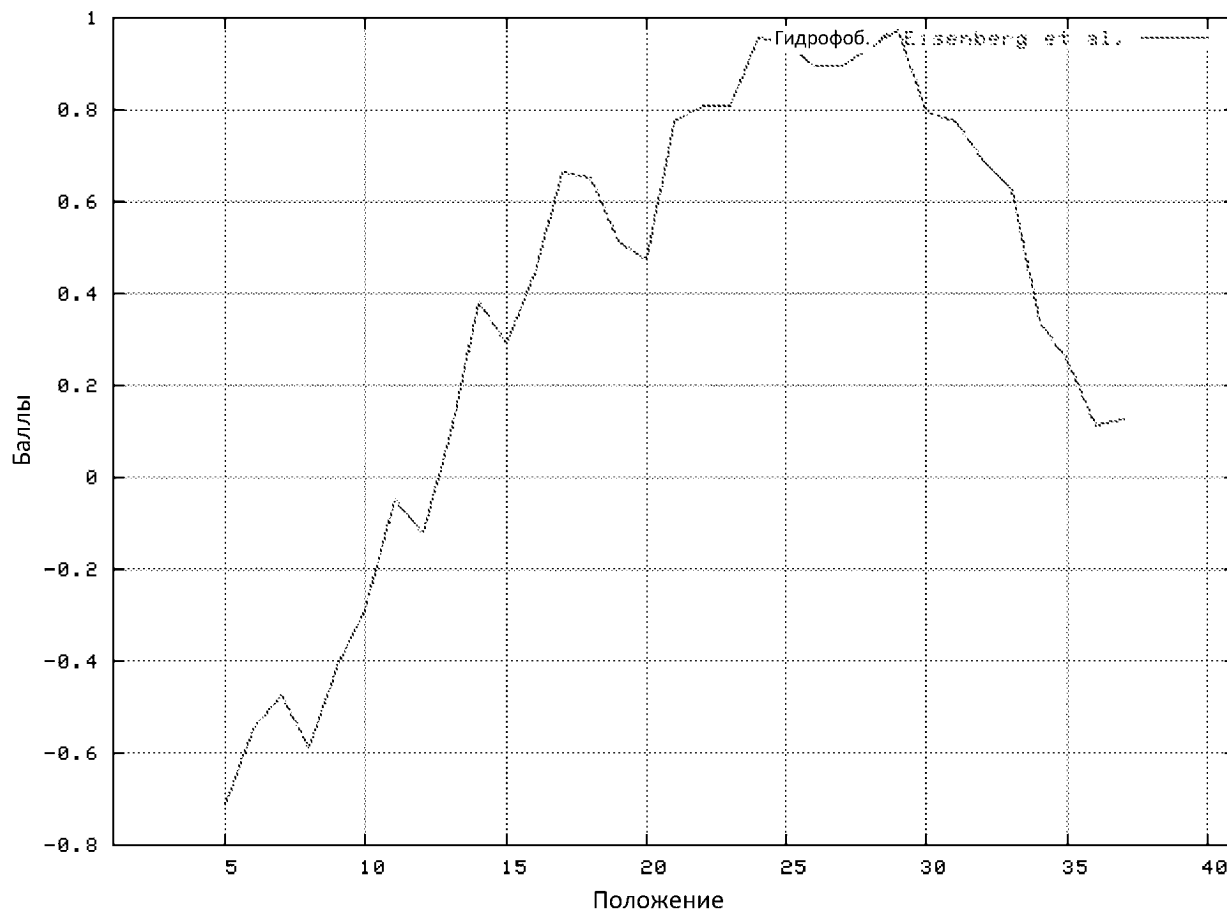
1	2	3	4	5	6	7	8	9
1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
край				центр				край

.....
 МИН : -0.711

МАКС : 0.972

Фиг. 9
(окончание)

Результаты Protoscale для пользовательской последовательности



Фиг. 10

Последовательность: *Rhodopseudomonas palustris*

10 20 30
WCGKEATEAY ATKTKGRAHT READELLPKY RIGRFAP

ДЛИНА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: 37

Индивидуальные величины для 20 аминокислот по шкале гидрофобности / Eisenberg et al. составляют:

Ala:	0.620	Arg:	-2.530	Asn:	-0.780	Asp:	-0.900	Cys:	0.290
Gln:	-0.850								
Glu:	-0.740	Gly:	0.480	His:	-0.400	Ile:	1.380	Leu:	1.060
Lys:	-1.500								
Met:	0.640	Phe:	1.190	Pro:	0.120	Ser:	-0.180	Thr:	-0.050
Trp:	0.810								
Tyr:	0.260	Val:	1.080	:	-0.840	:	-0.795	:	-0.000

Веса для положений окон 1,..,9, используя модель линейной вариации веса:

1	2	3	4	5	6	7	8	9
1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
край				центр				край

МИН : -0.829
МАКС : 0.000

Фиг. 10
(окончание)