



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **112863** (13) **C2**
(51) МПК

C07K 14/16 (2006.01)

A61K 39/21 (2006.01)

A61P 31/18 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки: а 2013 11896	(72) Винахідник(и): Дебр Патріс (FR), В'єйар Венсан (FR)
(22) Дата подання заявки: 13.04.2012	(73) Власник(и): ІНСТИТУТ НАСЬОНАЛЬ ДЕ ЛА САНТ ЕТ ДЕ ЛА РЕШЕРШ МЕДІКАЛЬ, 101 rue de Tolbiac F-75654 CEDEX 13 Paris, France (FR), ІННАВІРВАКС, Genopole Entreprises, Campus 1, 4 rue Pierre Fontaine, F-91058 Evry, France (FR)
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: 10.11.2016	(74) Представник: Тузюк Галина Олександрівна, реєстр. №394
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 11305451.4	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: Vieillard V. CCR5 or CXCR4 use influences the relationship between CD4 cell depletion, NKp44L expression and NK cytotoxicity in SHIV-infected macaques / V. Vieillard et al. // AIDS, London, GB. - 2008. - Vol. 22. - №2. - P. 185-192. Debre P. Towards a vaccine for HIV infection: role of the gp41 envelope protein / P. Debre et al. // Academie nationale de medecine, Bulletin, Paris, FR. - 2009. - Vol. 193. - №1. - P. 127-136. FR 2851165 A1, 20.08.2004. WO 2011005289 A2, 13.01.2011. WO 2010089402 A1, 12.08.2010. Vieillard V. A vaccine strategy against AIDS: an HIV gp41 peptide immunization prevents NKp44L expression and CD4+ T cell depletion in SHIV-infected macaques / V. Vieillard et al. // Proceedings of the national academy of sciences of USA, Washington, DC, US. - 2008. - Vol. 105. - №6. - P. 2100-2104.
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 15.04.2011	
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: EP	
(41) Публікація відомостей про заявку: 25.02.2014, Бюл.№ 4	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 10.11.2016, Бюл.№ 21	
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ РСТ/IB2012/051842, 13.04.2012	

(54) ІМУНОГЕННА КОМПОЗИЦІЯ ДЛЯ ПРОФІЛАКТИКИ І/АБО ЛІКУВАННЯ ІНФЕКЦІЇ, ЯКА ВИКЛИКАНА ВІРУСОМ ВІЛ

(57) Реферат:

Винахід стосується імуногенної композиції, що містить антигенний пептид, для попередження і/або лікування інфекції, яка викликана вірусом ВІЛ-1. Винахід також стосується антигенного пептиду, способу детектування і/або кількісного визначення антитіл до антигенного пептиду у зразку та набору для такого визначення.

UA 112863 C2

Галузь техніки

Даний винахід відноситься до попередження і лікування інфекції індивідуумів, яка викликана вірусом ВІЛ-1 (вірус імунодефіциту людини).

Рівень техніки

5 Приблизно 90 % ВІЛ-інфекцій людини викликано вірусом ВІЛ-1. Вірус імунодефіциту людини типу 1 (ВІЛ-1) характеризується сильною генетичною мінливістю, що викликано накопиченням мутацій, які виникають протягом реплікації вірусу, і також викликаною явищами рекомбінації. Відсутність результату протягом тривалого періоду хіміотерапевтичних методів лікування ВІЛ значною мірою пояснюється високою мутагенною активністю вірусних штамів ВІЛ-1. Раніше
10 було показано, що стійкі різновиди вірусу швидко виникали у пацієнтів після різних курсів антиретровірусної терапії і навіть після терапії з використанням багатьох лікарських засобів (HAART-високоактивна антиретровірусна терапія). Дані стійкі віруси несуть певні зміни в конформації і структурі своїх білків. Зазвичай такі мутації, відповідальні за ухилення ВІЛ-1 від сучасних способів лікування, які зберігаються в наступних поколіннях вірусу і накопичуються, як
15 результат селекції в умовах лікування.

Лікування лікарськими засобами проти ВІЛ-1 повністю не блокує реплікацію вірусу, що робить можливим добір і накопичення заздалегідь існуючих мутацій, які асоційовані зі стійкістю, а також знову виникаючих мутацій, таким чином, даючи можливість вірусу продовжувати поширюватися. Існуючі антиретровірусні лікарські засоби (NRTI (нуклеозидний інгібітор зворотної транскриптази), NNRTI (ненуклеозидний інгібітор зворотної транскриптази) інгібітори протеаз, інгібітори злиття та їх суміші, що подібні до HAART) можуть тільки сповільнити реплікацію ВІЛ-1 протягом більш або менш тривалого періоду часу, до виникнення і репродукції стійких вірусних штамів. Широке поширення стійких різновидів ВІЛ-1 викликає серйозні побоювання і вимагає наявності додаткових терапевтичних засобів проти ВІЛ-1.

25 Були розглянуті різні терапевтичні стратегії проти ВІЛ, що відрізняються від терапевтичних стратегій проти ВІЛ із застосуванням хімічних антиретровірусних речовин, які включають (i) застосування антитіл проти ВІЛ, (ii) вакцини на основі частинок зруйнованого вірусу ВІЛ, (iii) вакцини на основі пептидів ВІЛ та (iv) вакцини на основі ДНК плазмиди або вірусного вектора, причому будь-яка включає в себе свої конкретні недоліки.

30 Так як пандемія ВІЛ продовжує інфікувати мільйони людей щороку, зростає потреба в ефективній вакцині. Розвиток вакцин проти ВІЛ було сильно уповільнено внаслідок складності, що виникає при розробці імуногенного продукту, здатного викликати утворення нейтралізуючих антитіл проти ВІЛ широкого спектру дії.

Індукування при утворенні нейтралізуючих антитіл широкого спектру дії (bNAbs) проти первинних ізолятів вірусу імунодефіциту людини (ВІЛ) залишається головним і нереалізованим завданням при дослідженні вакцин проти СНІДу (синдром набутого імунодефіциту). Ранні спроби використання вакцин на основі капсул приводили до утворення антитіл, які є ефективними тільки проти ізолятів, адаптованих для використання в лабораторії. У даних прикладах захист корелював із високим титром bNAbs, спрямованим на гіперваріабельну область V3 gp120. Однак утворена нейтралізуюча дія є головним чином специфічною по відношенню до ізоляту і є мінімально ефективною по відношенню до більшості первинних ізолятів ВІЛ-1. Нездатність вакцин на основі субодиноці gp120 захищати від інфікування ВІЛ-1 на Фазі III клінічних випробувань підкреслює складність завдання.

Тим не менш, bNAbs може бути часто виявленим у ВІЛ-інфікованих індивідуумів. Відповіді, які викликано рано при інфікуванні, зазвичай є вузькоспецифічними, нейтралізуючи віруси, які поширюються у господаря, але не збігаються в часі. Такі відповіді поширюються протягом інфікування у деяких довгожителів, які здатні контролювати свою інфекцію у відсутності антивірусного лікування. Однак, суть відповіді, що полягає в утворенні перехресно-нейтралізуючих антитіл, і механізми, що призводять до його виникнення, не зрозумілі.

50 У природних умовах, NAb проти Env (ген білка оболонки) утворюються в межах тижнів після інфікування, але дана рання відповідь є ефективною лише проти певного вірусного підтипу; однак, bNAbs (перехресно-реагуючі нейтралізуючі антитіла) можуть вироблятися протягом розвитку ВІЛ. Нещодавно у кількох масштабних дослідженнях було показано, що приблизно 25 % ВІЛ-інфікованих пацієнтів (інфікованих протягом щонайменше 1 року) мають відповідь у вигляді утворення bNAbs, і 1 % "елітних нейтралізуючих агентів" з дуже високою активністю проти переважної більшості кладів. Важливо відзначити, що дані результати демонструють здатність імунної системи інфікованих індивідуумів до утворення Nab in vivo проти ВІЛ-1, протягом розвитку захворювання. Вони також наводять на думку про те, що активність Nab, реагуючих в широкій області, переважно, розвивається з часом, і їй сприяє тривала антигенна стимуляція, у відсутності знань щодо титру bNAbs, який був би захисним.

Постійна реплікація вірусу з низьким рівнем перешкод, призводить до постійної еволюції Env для ухилення від NAb. Така антигенна еволюція може зосереджувати увагу на новій стратегії вакцинації на основі більш консервативної області білка Env, та наводить на думку про те, що імунотенні вакцини могли б бути призначені для імітації ключових, висококонсервативних епітопів.

Однією з головних проблем розробки ефективних вакцин проти ВІЛ було те, що мішенню bNAb є білок вірусної оболонки (Env), яка є високоваріативною, тоді як консервативні елементи, переважно, є слабо імунотенними. Це означає, що кінетичні та просторові обмеження ускладнюють доступ bNAb до потенційно чутливих сайтів під час зв'язування з рецептором і процесів злиття. Насправді було описано невелику кількість NAb. Наприклад, першим ідентифікованим bNAb був b12, який закриває сайт зв'язування CD4 на gp120 і запобігає прикріпленню CD4. Субодиниця gp41 є набагато більш консервативною, ніж gp120, включаючи конформаційні перебудови, що характерні для всіх штамів. Дуже низьку bNAb активність виявляють по відношенню до консервативних структурних елементів gp41, які захищені, важкодоступні або є нестійкими; дані bNAb, включаючи 2F5 і 4E10, націлені на найближчу до мембрани ектодоменну область (MPER) gp41. Однак імунізація даними ключовими епітопами не приводила в результаті до утворення активності bNAb. Дане розділення між антигенними та імунотенними характеристиками все ще не зрозуміло.

У даній галузі все ще існує необхідність у терапевтичних засобах, які спрямовані на попередження або лікування інфекції, яка викликана вірусом ВІЛ-1.

Короткий опис винаходу

Даний винахід відноситься до імунотенної композиції, що включає в себе антигенний пептид нижченаведеної формули (I):

Nt-S-X1-X2-X3-K-X4-Ct (I) [Nt-SEQ ID № 1-Ct], де

- Nt складається з пептиду, що включає в себе від 0 до 100 амінокислот у довжину,

- Ct складається з пептиду, що включає в себе від 0 до 100 амінокислот у довжину,

- кожен з X1-X4 складається з амінокислотного залишку, де:

- (i) X1 позначає конкретну амінокислоту W, або (ii) X1 позначає будь-який амінокислотний залишок, за винятком W,

- (i) X2 позначає конкретну амінокислоту S, або (ii) X2 позначає будь-який амінокислотний залишок, за винятком S,

- (i) X3 позначає конкретну амінокислоту N, або (ii) X3 позначає будь-який амінокислотний залишок, за винятком N,

- (i) X4 позначає конкретну амінокислоту S, або (ii) X4 позначає будь-який амінокислотний залишок, за винятком S, за умови, що

- три з чотирьох амінокислотних залишків X1, X2, X3 і X4 позначають конкретну амінокислоту, що вищевказано у їх відповідному значенні (i), і

- амінокислотний залишок, який залишився серед X1-X4 позначає будь-який амінокислотний залишок, за винятком конкретного амінокислотного залишку, визначеного у своєму значенні (i), за умови, що пептид формули (I) не означає пептид SEQ ID № 18, який розкрито у заявці PCT, поданої 22 червня 2010 року за № PCT/US2010/001784 і опублікованої 13 січня 2011 року за № WO 2011/005289 від імені Президента і Членів ради Гарвардського коледжу.

Даний винахід також відноситься до імунотенної композиції, що включає антигенний пептид формули (I), як описано вище, для застосування в якості лікарського засобу.

Даний винахід також відноситься до імунотенної композиції, що включає антигенний пептид формули (I), як описано вище, для застосування в способі попередження і/або лікування інфекції індивідуума, що викликано вірусом ВІЛ-1.

Даний винахід відноситься до застосування імунотенної композиції, що включає антигенний пептид формули (I), як описано вище, для виготовлення лікарського засобу для запобігання і/або лікування інфекції індивідуума, що викликано вірусом ВІЛ-1.

У переважних втіленнях, значення (ii) одного чи більш ніж одного з X1, X2, X3 і X4 незалежно один від одного вибрано з групи амінокислотних залишків, що складається з цистеїну (Cys або C), аланіну (Ala або A), гліцину (Gly або G) і валіну (Val або V), проліну (Pro або P) і, найбільш переважно, аланіну.

У переважних втіленнях, тільки один з X1-X4 позначає амінокислотний залишок, який відрізняється від W (для X1), S (для X2), N (для X3) і S (для X4), відповідно.

У переважних втіленнях антигенний пептид формули (I) обрано із групи, що складається з:

- PWNASASNKSLDDIW (SEQ ID № 12),

- PWNASWANKSLDDIW (SEQ ID № 13),

- PWNASWSAKSLDDIW (SEQ ID № 14) і

- PWNASWSNKALDDIW (SEQ ID № 15),

Даний винахід також відноситься до імуногенної композиції, що включає антигенний пептид формули (I).

У переважних втіленнях антигенний пептид формули (I) ковалентно зв'язаний з молекулою-носієм.

У переважних втіленнях даної імуногенної композиції антигенний пептид формули (I), можливо пов'язаний з молекулою-носієм, яку об'єднано з одним чи більш ніж одним імуноад'ювантом.

Даний винахід також відноситься до пептиду формули (I), як описано в даному описі.

Винахід також відноситься до застосування антитіл, дія яких спрямована проти пептиду формули (I), при виготовленні лікарського засобу для запобігання і/або лікування індивідууму, якого інфіковано вірусом ВІЛ-1.

Даний винахід також відноситься до антитіл, дія яких спрямована проти пептиду вищевказаної формули (I).

Даний винахід також відноситься до способів діагностики ВІЛ-1, а також наборів для діагностики ВІЛ-1, в яких застосовується пептид формули (I).

Даний винахід відноситься до способів прогнозування ВІЛ-1, а також наборів для прогнозування ВІЛ-1, в яких застосовується пептид формули (I).

Він також відноситься до способів моніторингу стану ВІЛ-1 інфекції, при яких застосовується пептид формули (I), особливо у пацієнтів, які знаходяться на терапевтичному лікуванні ВІЛ-1 інфекції, а також наборів для здійснення таких способів моніторингу.

Опис графічних матеріалів

Фіг. 1. Вирівнювання амінокислотних послідовностей декількох пептидів формули (I).

Дикий тип: амінокислотна послідовність, що включає в білку gp41 штам HXB2 ВІЛ-1, яка може називатися "3S".

S613A (M1) і K617A (M5): амінокислотні послідовності, що включають в себе високу амінокислотну ідентичність із вищевказаним "Диким типом".

W614A, S615A, N616A і S618A: конкретні втілення пептиду формули (I).

Фіг. 2. Інфікуюча здатність ВІЛ-1 вірусу NL4.3, що включає аланінову заміну в мотиві 3S/gp41.

Клітини MT-2 інфікували 100 нг/мл р24 еквівалентного антигену з дикого типу (WT, білі стовпчики на діаграмі) або які мутували по аланіну 3S/gp41 (чорні стовпчики на діаграмі) вірусів NL4.3.

(А) антиген р24 кількісно визначали на 6-й день після інфікування. Результати, виражені у відносних одиницях по відношенню до дикого типу, представляють середнє \pm SD (стандартне відхилення) від трьох до семи незалежних препаратів клона плазмід, в залежності від мутантів.

(Б) Утворення синцитію кількісно визначали на 4-й день після інфікування, за допомогою стандартної фазово-контрастної мікроскопії. Результати, виражені у відносних одиницях по відношенню до дикого типу, представляють середнє \pm SD (стандартне відхилення) від двох до чотирьох окремих препаратів клону плазмід, в залежності від мутантів.

(В) Вивчення кінетики продукції антигену р24 в клітинному супернатанті первинних CD4⁺ Т клітин, які інфіковано диким типом (WT, ✕) або мутуванням по аланіну 3S/gp41 NL4.3 вірусом, включаючи S613A (■), W614A (ρ), S615A (◇), N616A (○), K617A (●) і S618A (□). Даний експеримент відповідає 2 незалежним експериментам, які проведено з окремими препаратами клона плазмід на очищених клітинах CD4⁺Т від двох незалежних здорових донорів.

(Г) Інфікуюча здатність Hela клітин P4C5 диким типом (WT, білі стовпчики на діаграмі) або мутуванням по аланіну 3S/gp41 (чорні стовпчики на діаграмі) NL4.3 вірусом. Клітини інфікували в трьох паралельних повторюваннях 4 нг/15000 клітин еквівалентного антигену р24 протягом 48 год., а активність β-галактозидази визначали в клітинних екстрактах. Результати, виражені у відносних одиницях щодо дикого типу, що є середнім \pm SD від трьох до чотирьох незалежних препаратів клона плазмід. Мутовані по аланіну віруси NL4.3 називаються: S613A, W614A, S615A, N616A, K617A і S618A.

Фіг. 3. Експресія NKp44L в CD4⁺ Т клітинах і дегрануляцію NK (природній кілер) клітин, опосередкована 3S/gp41 мутантами по аланіну.

(А) Очищені клітини CD4⁺Т не інфікували (пунктирні лінії), інфікували протягом ночі диким типом (WT) (чорні лінії) або різним мутуванням по аланіну вірусом NL4.3. Клітини фарбували лігандами для NCR (природний рецептор цитотоксичності) (NKp30-Ig, NKp44-Ig або NKp46-Ig білки злиття). Порогове значення на гістограмах встановлювали по CD4⁺Т клітинам. Накладення показує експресію лігандів NCR на ВІЛ-інфікованих клітинах в порівнянні з

неінфікованими клітинами. Числа відповідають частці CD4⁺T клітин, що експресують ліганди NCR.

(Б) Експресія NKp44L на очищених CD4⁺ T клітинах, які не обробляли (UT) або обробляли пептидами з дикого типу (WT) або з мутованими по аланіну синтетичними пептидами 3S/grp41 мотиву 3S/grp41. Клітини або фарбували або mAb (моноклональне антитіло) проти NKp44L або ізотопічним контролем IgM (імуноглобулін) (пунктирні лінії). Порогове значення на гістограмах встановлювали по підгрупі CD4⁺. Накладення показує експресію NKp44L порівняно з ізотопічним контролем. Числа відповідають частці CD4⁺T клітин, що експресують NKp44L.

(В) Активність дегрануляції оцінювали на активованих IL (інтерлейкін 2) клітинах NK (природна клітина-кілер) проти аутологічних клітин CD4⁺T, при Е/Т співвідношенні: 1/1, у присутності mAb проти CD107a. Очищені клітини CD4⁺T не інфікували (NI) або інфікували вночі диким типом (WT) або мутованими по аланіну 3S/grp41 вірусами NL4.3. На точковому графіку відкладали кількість NK клітин CD3⁺CD56⁺, в залежності від експресії NKp44 і CD107a. Число на будь-якій панелі відповідає частці позитивних NK клітин.

(Г) Ефективність дегрануляції NK клітин проти аутологічних очищених CD4⁺ T клітин при співвідношенні Е/Т: 1/1, у присутності mAb проти CD107a. CD4⁺ T клітини не обробляли (UT) або обробляли пептидами від дикого типу (WT) або мутованим по аланіну синтетичними пептидами мотиву 3S/grp41. CD4⁺T клітини інкубували з аутологічними NK клітинами, активованими IL2. Порогове значення на гістограмах встановлювали по клітинам NK CD3⁺CD56⁺, експресуючим NKp44. Накладення показує експресію CD107a NK клітинами, що аналізовано в присутності аутологічних клітин CD4⁺T, які оброблено або диким типом (WT), або синтетичними пептидами 3S/grp41 з мутацією по аланіну, порівняно з необробленими клітинами. Числа відповідають частці NK клітин, що експресують CD107a. Мутовані по аланіну віруси NL4.3, віруси або пептиди 3S/grp41 називаються S613A, W614A, S615A, N616A, K617A і S618A.

Фіг. 4. Нейтралізація вірусної інфекції та інгібування NKp44L на CD4⁺ T клітинах і дегрануляції NK клітин за допомогою мишачих Ig, що утворюються у даних мутантів 3S/grp41 по аланіну.

Очищені клітини CD4⁺T інфікували NL4.3 (ліва панель) або NDK (права панель) компетентними вірусами, попередньо інкубованими протягом 30 хв з очищеним Ig, які отримано з мишей, імунізованих тільки ад'ювантом (Ig-Adj, ♦), дикого типу (WT, ✕) або мутованим по аланіну 3S/grp41 вірусом NL4.3, що включає S613A (■), W614A (ρ), S615A (◇), N616A (○), K617A (●) і S618A (□).

(А) Компетентні віруси (200TCID₅₀) інкубували з очищеним Ig в різній концентрації, що знаходиться в інтервалі від 0 до 20 мкг/мл, протягом 30 хв з подальшим додаванням РНА (фітогемаглютинін)-активованих очищених CD4⁺T клітин. На 6 день після інфікування антиген р24 визначали кількісно в клітинному супернатанті.

(Б) Вплив, що залежить від часу. Компетентні віруси (200TCID₅₀) інкубували з 10 мкг/мл Ig протягом 30 хв з подальшим додаванням РНА-активованих очищених CD4⁺T клітин. Рівень р24 аналізували в клітинному супернатанті кожні 2 дні протягом 10 днів після інфікування.

(В) Експресію NKp44L на CD4⁺T визначали через 17 годин після інфікування. На гістограмах відкладали підгрупу клітин CD4⁺. Показана методом накладання експресія NKp44L порівняно з ізотиповим контролем IgM. Числа відповідають частці позитивних клітин.

(Г) Дегрануляція аутологічних NK клітин. CD4⁺T клітини інкубували з аутологічними NK клітинами при співвідношенні Е/Т: 1/1 в присутності mAb проти CD107a. На точковому графіку відкладали кількість клітин NK CD3⁺CD56⁺ в залежності від експресії NKp44 і CD107a. Число на будь-якій панелі відповідає частці позитивних клітин. Мутовані по аланіну віруси NL4.3 або пептиди 3S/grp41 називаються S613A, W614A, S615A, N616A, K617A і S618A.

Фіг. 5. Нейтралізація вірусної інфекції та інгібування NKp44L на CD4⁺ клітинах і дегрануляція клітин NK за допомогою імунопреципітованого антитіла до W614A, виділеного з ВІЛ-інфікованих пацієнтів.

РНА-активовані CD4⁺T клітини інфікували NL4.3 (ліва панель) або NDK (права панель) компетентними вірусами, попередньо інкубованих протягом 30 хв з моноклональним антитілом до 3-S-WT (Anti-3S, ○), з очищеним імуносорбційним методом антитілом до 3S-WT, що отримано від 1 ВІЛ-інфікованого пацієнта (#117, □) або з очищеним імуносорбційним методом антитілом до 3S-W614A, що отримано від 5 ВІЛ-інфікованих пацієнтів: #24 (●), #44 (■), #65 (▲), #71 (▼) і #109 (◆).

(А) Компетентні віруси (200TCID₅₀) інкубували з очищеним імуносорбційним методом антитілом в різній концентрації, що знаходиться в інтервалі від 0 до 2 мкг/мл, протягом 30 хв з подальшим додаванням CD4⁺T клітин. На 6 день після інфікування антиген р24 визначали кількісно в клітинному супернатанті.

(Б) Вплив, що залежить від часу. Компетентні віруси (200TCID₅₀) інкубували з 1мкг/мл очищеного імуносорбційним методом Ab протягом 30 хв з подальшим додаванням РНА-активованих очищених CD4⁺T клітин. Рівень р24 аналізували в клітинному супернатанті кожні 2 дні протягом 10 днів після інфікування.

5 (В) Експресію NKp44L на клітинах CD4⁺T визначали через 17 годин після інфікування. На гістограмах відкладали підгрупу клітин CD4⁺T. Показана методом накладання експресія NKp44L порівняно з ізотопічним контролем IgM. Числа відповідають частці позитивних клітин.

(Г) Дегрануляція аутологічних NK клітин. CD4⁺T клітини інкубували з аутологічними NK клітинами при співвідношенні Е/Т: 1/1 в присутності mAb проти CD107a. На точковому графіку відкладено число клітин NK CD3⁺CD56⁺ в залежності від експресії NKp44 і CD107a. Число на будь-якій панелі відповідає частці позитивних клітин NK. Мутовані по аланіну віруси NL4.3 або пептиди 3S/grp41 називають S613A, W614A, S615A, N616A, K617A і S618A.

Фіг. 6. Експресія NKp44L та дегрануляція аутологічних клітин NK, опосередкована інактивованими нагріванням мутантами по аланіну 3S/grp41 на клітинах CD4⁺T.

15 Очищені клітини CD4⁺T не обробляли або обробляли протягом ночі 100 нг р24 еквівалентного антигену на мл інактивованого нагріванням вірусу дикого типу (WT) NL4.3 або з різними мутантами за аланіну вірусів 3S/grp41.

(А) Експресію NKp44L на CD4⁺T визначали через 17 годин після інфікування. Порогове значення на гістограмах встановлювали по підгрупі клітин CD4⁺T. Накладення показує експресію NKp44L порівняно з ізотопічним контролем IgM. Числа відповідають частці позитивних клітин.

(Б) Дегрануляція аутологічних NK клітин. CD4⁺T клітини інкубували з аутологічними NK клітинами при співвідношенні Е/Т: 1/1 в присутності mAb проти CD107a. На точковому графіку відкладено число клітин NK CD3⁺CD56⁺ в залежності від експресії NKp44 і CD107a. Число на будь-якій панелі відповідає частці позитивних клітин NK. Мутовані по аланіну віруси NL4.3 або пептиди 3S/grp41 називають S613A, W614A, S615A, N616A, K617A і S618A.

Докладний опис винаходу

Згідно з даним винаходом головним чином запропоновано імуногенні композиції або вакцинні композиції проти ВІЛ-1, де імуногенні композиції або композиції вакцини включають конкретні антигенні пептиди, що роблять, переважно, можливою індукцію утворення нейтралізуючих антитіл проти ВІЛ-1 широкого спектру дії.

В ідеальному випадку ефективна ВІЛ-1 вакцина повністю блокує інфекцію. В дійсності може бути більш реалістичним розробити близьку до оптимальної безпечну і ефективну вакцину, яка значно знижує інфікування, так і запобігає елімінацію CD4⁺T клітин. Головна мета даної стратегії пов'язана зі здатністю генерувати утворення нейтралізуючих антитіл широкого спектру дії (bNAbs), володіють також здатністю діяти на елімінацію CD4⁺T клітин, що здавалося нездійсненним на попередньому рівні техніки.

Таким чином, згідно з даним винаходом запропоновано нові речовини і композиції для попередження і/або лікування інфекції організму ссавця, переважно людину, яку викликано вірусом ВІЛ-1.

Згідно винаходу виявили, що сімейство конкретних пептидів, які розділяють високу ідентичність послідовності з відомим grp41-похідним пептидом під назвою "3S", викликають *in vivo* продукцію bNAbs проти ВІЛ-1.

В даному документі показано, що дані конкретні пептиди викликають високу нейтралізуючу активність і нейтралізуючу активність широкого спектру дії проти різних клінічних ізолятів вірусу ВІЛ-1, порівняно з відомими пептидами, які є похідними від grp41 білка ВІЛ-1, включаючи відомий пептид "3S", який наведено вище.

Дуже важливим є те, що згідно винаходу було також виявлено, що дані конкретні пептиди не ініціюють чутливість CD4⁺T клітин до лізису, що здійснюється клітинами NK, незважаючи на те, що повна функціональність клітин NK, включаючи дегрануляцію, залишається незмінною.

Крім того, показали, що антитіла до даних конкретних пептидів блокують чутливість CD4⁺T клітин до лізису, що здійснюється NK клітинами, який стимулюється при розвитку інфекції, що викликано вірусом ВІЛ-1.

Даний винахід відноситься до імуногенної композиції, що включає в себе антигенний пептид нижченаведеної формули (I):

Nt-S-X1-X2-X3-K-X4-Ct (I) [Nt-SEQ ID № 1-Ct], де

- Nt складається з пептиду, що включає в себе від 0 до 100 амінокислот у довжину,
- Ct складається з пептиду, що включає в себе від 0 до 100 амінокислот у довжину,
- кожен з X1-X4 складається з амінокислотного залишку, де:

- (i) X1 позначає конкретну амінокислоту W, або (ii) X1 позначає будь-який амінокислотний залишок, за винятком W,

- (i) X2 позначає конкретну амінокислоту S, або (ii) X2 позначає будь-який амінокислотний залишок, за винятком S,

5 - (i) X3 позначає конкретну амінокислоту N, або (ii) X3 позначає будь-який амінокислотний залишок, за винятком N,

- (i) X4 позначає конкретну амінокислоту S, або (ii) X4 позначає будь-який амінокислотний залишок, за винятком S,

за умови, що

10 - три із чотирьох амінокислотних залишків X1, X2, X3 і X4 позначають конкретну амінокислоту, яку визначено у їх відповідному вищевказаному значенні (i), і

- амінокислотний залишок, який залишився серед X1-X4 позначає будь-який амінокислотний залишок, за винятком конкретного амінокислотного залишку, визначеного у своєму значенні (i), за умови, що пептид формули (I) не означає пептид SEQ ID № 18, який розкрито у заявці PCT, що опубліковано як WO 2011/005289.

15 Пептид SEQ ID № 18, який описано у заявці PCT, що опубліковано як WO 2011/005289, має наступну амінокислотну послідовність: "Ac-NHNHRIRTNPAlVK(Ac)TENSWSNKAkSICQQQ-NH₂" (SEQ ID № 16 даної заявки на патент).

20 Nt пептид, що включає в себе від 0 до 100 амінокислотних залишків у довжину, охоплює пептиди, що включають в себе 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 і 100 амінокислотних залишків у довжину.

25 Ct пептид, що включає в себе від 0 до 100 амінокислотних залишків у довжину, охоплює пептиди, що включають в себе 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 і 100 амінокислотних залишків у довжину.

30 Як вже згадувалося раніше, пептид формули (I), при застосуванні в імунотенній композиції, переважно в комбінації з одним чи більш ніж одним імунотенювантом, викликає продукцію антитіл, які блокують інфікування CD4⁺T клітин вірусами ВІЛ-1 і/або блокують поширення вірусу ВІЛ-1 на неінфіковані CD4⁺T клітини, як показано, на майже невиявленій продукцією р24 CD4⁺T клітинами, що наведено в контакт як з вірусами ВІЛ-1, так і з антитілами, що спрямовані проти пептиду формули (I).

35 Додатково, на відміну від інших ВІЛ-похідних пептидів, які застосовували в даній області в якості антигенів ВІЛ, включаючи "3S" пептид (що показано на фіг. 1), пептид формули (I) не ініціює експресію NKp44L на поверхні CD4⁺T клітин і таким чином не ініціює руйнування CD4⁺T клітин клітинами NK.

40 Більш того, антитіла, що утворені в індивідуумах, імунізованих пептидом формули (I), здатні блокувати опосередкований NKp44L лізис CD4⁺T клітин, що здійснюється NK клітинами, без порушення будь-якої іншої функції NK клітин, які включають дегрануляцію.

45 Таким чином, згідно з даним винаходом запропоновано високоефективний терапевтичний засіб, який можна застосовувати для профілактики, і для лікування інфекції, яку викликано вірусом ВІЛ-1.

50 Імунотенна композиція, яку застосовують згідно винаходу, включає антигенний пептид формули (I), який, при введенні даної імунотенної композиції індивідууму, збільшує продукцію антитіл, спрямованих проти зазначеного пептиду формули (I), які наділені нейтралізуючими властивостями по відношенню до безлічі клінічних ізолятів ВІЛ-1, як показано в прикладах в даному документі. Як проілюстровано додатково в даному описі, антигенний пептид формули (I) може бути переведений в імунотенний стан за допомогою сполуки з молекулою-носієм і/або за допомогою комбінації з одним чи більш ніж одним імунним ад'ювантом.

55 Імунотенну композицію, що включає поліпептид формули (I), можна застосовувати профілактично проти інфекції, що викликано вірусом ВІЛ-1, викликаючи утворення антитіл, які сильно знижують або навіть блокують інфікування клітин CD4 даним вірусом ВІЛ-1.

60 Імунотенну композицію, що включає поліпептид формули (I), можна застосовувати для лікування інфікованого ВІЛ-1 індивідуума, викликаючи утворення антитіл, які сильно знижують або навіть блокують інфікування CD4⁺T клітин вірусами ВІЛ-1, які вже реплікувались в інфікованому індивідуумі.

Як показано в прикладах в даному документі, антитіла проти ВІЛ-1, які отримують після імунізації ссавця імуногенною композицією, що включає в себе антигенний пептид формули (I), яка складаються з нейтралізуючих антитіл, які можуть володіти IC_{50} (напівмаксимальна інгібуюча концентрація) менше ніж 20 мкг/мл, в аналізі $CD4^+T$ клітин-р24.

5 Зазвичай аналіз $CD4^+T$ клітин-р24 включає стадії:

а) отримання досліджуваної суміші за допомогою приведення компетентного по відношенню до реплікації вірусу ВІЛ-1 у контакт з відомою кількістю антитіл, що підлягають тестуванню,

б) інкубування РНА-активованих $CD4^+T$ клітин з тестуючою сумішшю, що отримано наприкінці стадії а), в присутності IL-2 і

10 в) визначення активності р24 в клітинних культурах $CD4^+T$, отриманих у кінці стадії б), і

г) визначення значення IC_{50} тестованих антитіл за допомогою порівняння активності р24, визначеної на стадії в), для відомої кількості антитіл, які додано на стадії а), з активністю р24, що виявлено в тому ж самому тесті, де стадію а) проводять у відсутності антитіл проти ВІЛ.

15 Як правило, для виконання аналізу нейтралізації, описаного вище, проводять серію випробувань, коли на стадії а) застосовують зростаючу відому кількість антитіл, які тестуються. Повністю докладний опис аналізу нейтралізації надано в прикладах даного документу.

Отримані авторами винаходу результати показують, що імуногенну композицію, що включає антигенний пептид формули (I), можна застосовувати з високим ступенем безпеки для індивідуума, який потребує її, так як дана імуногенна композиція не викликає небажаних побічних ефектів, а саме не впливає на функціональність клітин $CD4^+T$, порівняно з відомими антигенними пептидами проти ВІЛ (наприклад, "3S" пептид, показаний на фіг. 1).

Додатково, імуногенна композиція, що включає в себе антигенний пептид формули (I), є дуже потужним терапевтичним засобом проти ВІЛ завдяки своїй плейотропній дії проти ВІЛ-1 інфекції, включаючи (i) утворення антитіл, наділених нейтралізуючою активністю широкого спектру дії проти цілого ряду клінічних ізолятів ВІЛ-1 і (ii) блокування лізису $CD4^+T$ клітин, що здійснюється клітинами NK.

Більш того, імуногенна композиція, що включає в себе антигенний пептид формули (I), наділена високою селективністю дії, так як, для ілюстрації, вона порушує виключно активність NK клітин, яка спрямована проти $CD4$, в той же самий час, не надаючи впливу на важливу функцію антимікробного імунітету клітин NK, подібно дегрануляції.

Таким чином, імуногенна композиція, що включає в себе антигенний пептид формули (I), (i) має активність, яка спрямована проти ВІЛ-1, за допомогою індукції утворення нейтралізуючих антитіл проти ВІЛ-1 широкого спектру дії, і (ii) захищає функціональність імунної системи ВІЛ-1-інфікованого індивідуума, (а) захищаючи $CD4^+T$ клітини від руйнування і (б) стежить за тим, щоб неспецифічні антимікробні функції імунної системи залишалися повністю функціональними.

Ілюстративні втілення пептидів формули (I) розкриті на фіг. 1, які включають "W614A" або "M2" (SEQ ID № 12 в даному документі), (ii) "S615A" або "M3" (SEQ ID № 13 в даному документі), (iii) "N616A" або "M4" (SEQ ID № 14 в даному документі) і (iv) "S618A" або "M6" (SEQ ID № 15 в даному документі).

40 Важливим є те, що, як показано у прикладах даного документа, інші пептиди, які включають в себе високий рівень амінокислотної ідентичності з пептидами формули (I), які подібні конкретним пептидам, названим S613A (або "M1") і K617A (або "M5"), що представлено на фіг. 1, не наділені будь-якою властивістю проти ВІЛ пептидів формули (I). Для ілюстрації, пептиди S613A і K617A (i) не викликають утворення нейтралізуючих антитіл проти ВІЛ, (ii) ініціюють експресію NKp44L клітинами $CD4$ і таким чином також чутливість $CD4^+T$ клітин до лізису, що здійснюється NK клітинами, і (iii) не викликають продукцію антитіл, здатних знижувати або блокувати чутливість $CD4^+T$ клітин до лізису, що здійснюється NK клітинами.

Дуже несподівано, як показали автори винаходу, що пептиди S613A і K617A, які вищевказано, викликають утворення антитіл, які добре розпізнають послідовності дикого типу, який експресовано вірусами ВІЛ-1, незважаючи на те, що дані пептиди не здатні викликати утворення нейтралізуючих антитіл проти ВІЛ-1 вірусів.

Також дуже несподівано, як показано в прикладах даного документа, що пептиди формули (I) викликають утворення антитіл, які не взаємодіють з послідовностями дикого типу, який експресовано вірусами ВІЛ-1, як показано в Таблиці 4. Дані несподівані результати говорять про те, що пептиди формули (I) структурно відрізняються від відповідних послідовностей ВІЛ-1 дикого типу, хоча вони викликають утворення нейтралізуючих антитіл проти ВІЛ-1 широкого спектру дії. Дані результати явно суперечать тому, що очікував би фахівець в даній області при пошуку антигенних сполук для індукції ефективної імунної відповіді на інфекцію, що викликано вірусом ВІЛ-1.

З іншої сторони, пептиди, які включають в себе послідовності, близькі до пептиду формули (I), що подібні до наведених вище S613A і K617A пептидів, очевидно, структурно тісно пов'язані з послідовностями ВІЛ-1 дикого типу і здатні викликати утворення антитіл, які розпізнають дані послідовності дикого типу, хоча дані антитіла не володіють будь-якими властивостями антитіл проти ВІЛ-1.

Результати, викладені в даному документі, показують, що спеціаліст в даній області не міг очікувати (i) ні безпеки пептиду формули (I), ні (ii) різних, спрямованих проти ВІЛ властивостей антитіл до пептиду формули (I).

Додатково, очікується, що пептид формули (I) володіє лінійною просторовою структурою.

Автори винаходу також показали, що антитіла, які спрямовані проти пептиду формули (I), можуть бути виявлені у невеликого числа індивідумів, інфікованих ВІЛ-1 вірусом. Виявили сильну кореляцію між (i) наявністю антитіл, спрямованих проти пептиду формули (I) у даних ВІЛ-1-інфікованих індивідумів, і (ii) низьким ВІЛ-1 вірусним навантаженням, а також великою кількістю CD4⁺T клітин. Дані результати очевидно показують високу ефективність in vivo антитіл, які спрямовані проти пептиду формули (I), для попередження і/або лікування інфекції індивідума, що викликано вірусом ВІЛ-1.

Приклади даного документа також ілюструють, що мутація вірусу ВІЛ-1, яка кодує мутантний білок gp41, що несе одну з мутацій W614A і S618A, які представлені у втіленнях пептидів формули (I), включають в себе сильно знижену здатність інфікувати людську лімфобластну клітинну лінію і не ініціюють експресію NKp44L CD4⁺T клітинами. Дані результати говорять про те, що нездатність пептиду формули (I) ініціювати експресію NKp44L CD4⁺T клітинами також виявляють в суцільних вірусах, які експресують конкретні варіанти gp41 білків.

У даному контексті попередження або лікування інфекції індивідума, яку викликано ВІЛ-1 вірусом, охоплює (i) попередження або лікування захворювання, пов'язаного з інфекцією даного індивідума, яку викликано вірусом ВІЛ-1, включаючи СНІД, та (ii) попередження розвитку ВІЛ-1 захворювання.

У даному контексті термін "ВІЛ-інфекція" головним чином охоплює інфікування тварини-хазяїна, переважно людини, вірусом імунодефіциту людини (ВІЛ-1) типу 1. "ВІЛ-1" можна використовувати в даному документі для того, щоб посилатися на будь-які штами, форми, підтипи, класи та різновиди в сімействі ВІЛ-1. Таким чином, лікування ВІЛ-1 інфекції буде охоплювати лікування суб'єкта, який є носієм будь-якого з сімейства ВІЛ-1 ретровірусів, або суб'єкта, у якого діагностовано активний СНІД, а також лікування або профілактику станів, пов'язаних зі СНІДом, у таких суб'єктів. Носія ВІЛ-1 можна ідентифікувати будь-якими способами, відомими з рівня техніки. Наприклад, суб'єкт може бути ідентифікований як носій ВІЛ-1 на основі того, що суб'єкт є позитивним щодо антитіл проти ВІЛ-1 або ВІЛ-1-позитивним, або має симптоми СНІДу. Тобто, під "лікуванням ВІЛ-1 інфекції" слід розуміти лікування пацієнта, який перебуває на будь-якій одній з декількох стадій розвитку інфекції ВІЛ-1, які, наприклад, включають синдром гострої первинної інфекції (які можуть бути безсимптомними або пов'язані з грипоподібним захворюванням та лихоманками, поганим самопочуттям, діареєю та неврологічною симптоматикою, такий як головний біль), безсимптомну інфекцію (яка є тривалим латентним періодом з поступовим зниженням числа циркулюючих в крові CD4⁺T клітин) і СНІД (який характеризується більш серйозними захворюваннями, які визначаються як СНІД, і/або зниженням числа циркулюючих в крові CD4 клітин нижче рівня, який сумісний з ефективною імунною функцією). Додатково, "лікування або попередження ВІЛ-1 інфекції" буде також охоплювати лікування пацієнта з підозрою на інфекцію, викликану ВІЛ-1, після впливу на підозрюваного ВІЛ-1, внаслідок, наприклад, контакту із зараженою ВІЛ-1 кров'ю, переливання крові, заміни рідин організму, "небезпечного" сексу з інфікованим суб'єктом, випадкового уколу голкою, нанесення татування або голковколів зараженими інструментами, або передачі вірусу від матері до дитини під час вагітності, пологів або незабаром після цього.

Термін "лікування ВІЛ-1 інфекції" слід розуміти в контексті антиретровірусної терапії, є пацієнти повністю сприйнятливими або частково сприйнятливими до такої терапії з точки зору вірусного навантаження і/або числа CD4⁺T клітин.

Термін "попередження ВІЛ-1 інфекції" може охоплювати лікування суб'єкта, який не інфіковано ВІЛ-1, але, як вважають, піддається ризику інфікування ВІЛ-1, рано чи пізно.

Під терміном "лікування СНІДу" мається на увазі лікування пацієнта, у якого виявляються більш серйозні захворювання, що визначають СНІД, і/або зниження кількості циркулюючих в крові клітин CD4⁺T клітини нижче рівня, який сумісний з ефективною імунною функцією. Термін "лікування СНІДу" також охоплює лікування пов'язаних зі СНІДом станів, під якими маються на увазі розлади і захворювання, властиві або пов'язані зі СНІД або ВІЛ-1 інфекцією, такі як СНІД-асоційований комплекс (ARC), прогресуюча генералізована лімфаденопатія (PGL),

захворювання, позитивні по відношенню до антитілам проти ВІЛ, і ВІЛ - позитивні захворювання, неврологічні захворювання, пов'язані зі СНІДом, (такі як деменція або тропічний паразитоз), саркома Капоші, тромбоцитопенія пурпурова і пов'язані опортуністичні інфекції, такі як інтерстиціальна плазмодіозна пневмонія, мікробактеріальний туберкульоз, кандидоз стравоходу, токсоплазмоз мозку, CMV (цитомегаловірусний) ретиніт, енцефалопатія, пов'язана з ВІЛ, синдром виснаження при ВІЛ-1-інфекції і т.д.

Таким чином, під терміном "попередження СНІДу" в даному контексті мається на увазі попередження у пацієнта, у якого є ВІЛ-1 інфекція, або пацієнта з підозрою на ВІЛ-1 інфекцію, або пацієнта, який наражається на ризик інфікування ВІЛ-1, розвитку СНІДу (який характеризується більш серйозними захворюваннями, який визначається як СНІД, і/або зниженням числа циркулюючих в крові CD4⁺T клітин нижче рівня, який сумісний з ефективною імунною функцією) і/або захворювань, пов'язаних зі СНІДом.

Таким чином, під терміном "попередження розвитку ВІЛ-1" в даному контексті мається на увазі попередження у пацієнта, у якого є ВІЛ-1 інфекція, зниження його кількості CD4⁺T клітин і/або попередження збільшення вірусного навантаження, двох головних маркерів, пов'язаних з ускладненням захворювання і збільшенням тяжкості захворювання.

В даному контексті амінокислотні залишки охоплюють аланін (також названий "A" або "Ala"), аргінін (також названий "R" або "Arg"), аспарагін (також названий "N" або "Asn"), аспарагінова кислота (також названа "D" або "Asp"), цистеїн (також названий "C" або "Cys"), глутамін (також названий "Q" або "Gln"), глутамінова кислота (також названа "E" або "Glu"), гліцин (також названий "G" або "Gly"), гістидин (також названий "H" або "His"), ізолейцин (також названий "I" або "Ile"), лейцин (також названий "L" або "Leu"), лізин (також названий "K" або "Lys"), метіонін (також названий "M" або "Met"), фенілаланін (також названий "F" або "Phe"), пролін (також названий "P" або "Pro"), серин (також названий "S" або "Ser"), треонін (також названий "T" або "Thr"), триптофан (також названий "W" або "Trp"), тирозин (також названий "Y" або "Tyr") і валін (також названий "V" або "Val").

Всі амінокислоти в пептидах щодо винаходу можуть перебувати як у D-, так і в L-формі, хоча в природі зустрічаються переважно L-форми.

Таким чином, в пептиді вищенаведеної формули (I), коли амінокислотний залишок X1 позначає (ii) будь-який амінокислотний залишок, за винятком W, тоді амінокислотний залишок X1 може позначати будь-які з амінокислотних залишків A, R, N, D, C, Q, E, G, H, I, L, K, M, F, P, T, S, Y або V. Таке ж пояснення застосовують для позначень будь-яких X1, X2, X3 і X4 амінокислотних залишків антигенного пептиду формули (I).

Не бажаючи бути пов'язаними з будь-якою певною теорією, автори винаходу вважають, що пептид формули (I) є просторово лінійним, будучи суспендованим в фізіологічно сумісному сольовому розчині (наприклад, 0,15 M розчин NaCl).

Таким чином, в деяких втіленнях пептиду формули (I) значення (ii) будь-якого з амінокислотних залишків X1, X2, X3 і X4, включає в себе амінокислотний залишок, який не генерує зміну просторової конформації, в порівнянні з амінокислотним залишком позначення (i) X1, X2, X3 і X4 відповідно.

У деяких втіленнях пептиду формули (I), значення (ii) будь-якого з амінокислотних залишків X1, X2, X3 і X4 включає в себе незаряджений амінокислотний залишок невеликого розміру.

У деяких втіленнях пептиду формули (I) значення (ii) будь-якого з амінокислотних залишків X1, X2, X3 і X4 вибрано з групи, що складається з аланіну (Ala або A), цистеїну (Cys або C), гліцину (Gly або G) і валіну (Val або V).

У деяких втіленнях пептиду формули (I) значення (ii) будь-якого з амінокислотних залишків X1, X2, X3 і X4 вибрано з групи, що складається з аланіну (Ala або A), цистеїну (Cys або C), гліцину (Gly або G), валіну (Val або V) і проліну (Pro або P).

В деяких переважних втіленнях пептиду формули (I) значення (ii) будь-якого з амінокислотних залишків X1, X2, X3 і X4 включає незаряджений амінокислотний залишок невеликого розміру, що включає неполярний бічний ланцюг. Деякі переважні незаряджені амінокислотні залишки невеликого розміру вибрані з групи, що складається з гліцину (Gly або G), аланіну (Ala або A), валіну (Val або V), лейцину (Leu або L), ізолейцину (Ile або I), метіоніну (Met або M), фенілаланіну (Phe або F), проліну (Pro або P) і триптофану (Trp або W). Більш переважно, незаряджені амінокислотні залишки невеликого розміру, що включають неполярний бічний ланцюг, які вибрано з групи, що складається з гліцину (Gly або G), аланіну (Ala або A), валіну (Val або V), лейцину (Leu або L), ізолейцину (Ile або I), проліну (Pro або P) і метіоніну (Met або M). В інших переважних втіленнях незаряджені амінокислотні залишки невеликого розміру, що включають неполярні бічні ланцюги, які вибрано з групи, що складається з гліцину (Gly або

G), аланіну (Ala або A), валіну (Val або V), лейцину (Leu або L), ізолейцину (Ile або I) і метіоніну (Met або M).

У деяких даних переважних втіленнях значення (ii) будь-якого з амінокислотних залишків X1, X2, X3 і X4 вибрано з групи, що складаються з аланіну (Ala або A), гліцину (Gly або G) і валіну (Val або V).

У деяких переважних втіленнях пептиду формули (I) значення (ii) будь-якого з амінокислотних залишків X1, X2, X3 і X4 включає залишок аланіну (Ala або A).

У деяких втіленнях пептиду формули (I) кожен з чотирьох амінокислотних залишків X1, X2, X3 і X4 позначає своє значення (ii).

У деяких втіленнях пептиду формули (I) три амінокислотні залишки серед X1, X2, X3 і X4 позначають, незалежно один від двох інших, своє значення (ii), а четвертий амінокислотний залишок серед X1, X2, X3 і X4 позначає своє значення (i).

У деяких втіленнях пептиду формули (I) два амінокислотні залишки серед X1, X2, X3 і X4 позначають, незалежно один від двох інших, своє значення (ii), а два інших амінокислотні залишки серед X1, X2, X3 і X4 позначають, незалежно один від іншого, своє значення (i).

В деяких переважних втіленнях пептиду формули (I) тільки один амінокислотний залишок серед X1, X2, X3 і X4 позначає значення (ii), а будь-який з інших амінокислотних залишків серед X1, X2, X3 і X4 позначає своє значення (i).

Таким чином, в деяких переважних втіленнях пептиду вищенаведеної формули (I):

- X1 позначає вищенаведене значення (ii), а кожен із X2, X3 і X4 позначає своє відповідне вищенаведене значення (i), або

- X2 позначає вищенаведене значення (ii), а кожен з X1, X3 і X4 позначає своє відповідне вищенаведене значення (i), або

- X3 позначає вищенаведене значення (ii), а кожен з X1, X2 і X4 позначає своє відповідне вищенаведене значення (i), або

- X4 позначає вищенаведене значення (ii), а кожен з X1, X2 і X3 позначає своє відповідне вищенаведене значення (i).

Вищенаведені втілення є найбільш переважними, так як вважають, що одна заміна амінокислоти (тобто один амінокислотний залишок, що позначає значення (ii)) серед X1, X2, X3 і X4 мінімізує ризик зміни просторової конформації порівняно з пептидом, де всі із X1, X2, X3 і X4 залишків позначають своє відповідне значення (i), і таким чином збільшить шанси того, щоб обумовлювати хороші властивості, спрямовані проти ВІЛ, тобто викликати утворення нейтралізуючих антитіл проти ВІЛ.

У ще одних втіленнях антигенного пептиду формули (I) даний антигенний пептид включає амінокислотну довжину, становить не більше ніж 200 амінокислотних залишків. Дані втілення охоплюють пептиди формули (I), що включають 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199 і 200 амінокислотних залишків у довжину. У деяких з даних переважних втілень пептид формули (I) включає від 10 до 26 амінокислотних залишків у довжину, який включає від 15 до 20 амінокислотних залишків у довжину.

Пептид формули (I) у даному контексті можна отримувати відомим методом клонування або шляхом хімічного синтезу.

Наприклад, ДНК, що кодує пептид формули (I), отримують шляхом застосування методу клонування і вставляють у автономно реплікаційний вектор з отриманням рекомбінантної ДНК. Рекомбінантну ДНК вводять до відповідного господаря, такого як *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Actinomyces*, дріжджі, нитковий гриб, рослинна клітина, клітина комахи і тваринна клітина, з отриманням трансформанта. З культивованого продукту трансформанта можна отримувати пептид, що включає пептид формули (I). В якості альтернативи, отримують ДНК, що кодує пептид формули (I) і поміщають її в безклітинну білковосинтезуючу систему з використанням зародків пшениці і клітинного екстракту з *Escherichia coli* для синтезу пептиду щодо винаходу. У деяких втіленнях, коли пептид формули (I) пов'язаний з білком-носієм, тоді імуногенний продукт, що складається з білка злиття, що складається як з пептиду формули (I),

так і з необхідного білока-носія, може бути синтезований за допомогою технології рекомбінантних ДНК.

Більш того, застосовуючи загальноприйнятий спосіб хімічного синтезу для пептиду формули (I), такий як "твердофазний метод" або "рідкофазний метод", амінокислоти вдало пов'язують і

Крім того, коли пептид формули (I) пов'язаний з необхідним пептидом або поліпептидом, наприклад, з білковою молекулою-носієм, можна синтезувати імуногенний продукт, що включає антигенний пептид формули (I).

Пептид формули (I) охоплює наступні антигенні пептиди:

- Nt-S-X-S-N-K-S-Ct (Ia) - (Nt-SEQ ID №2-Ct),
- Nt-S-W-X-N-K-S-Ct (Ib) - (Nt-SEQ ID № 3-Ct),
- Nt-S-W-S-X-K-S-Ct (Iv) - (Nt-SEQ ID № 4-Ct) і
- Nt-S-W-S-N-K-X-Ct (Iv) - (Nt-SEQ ID № 5-Ct),

де:

- Nt і Ct відносяться до одного і того ж значення, як для пептиду формули (I), визначеного вище, і

- X є будь-яким амінокислотним залишком, за винятком: W (Ia), S (Ib), N (Iv) та S (Iv).

У даних втіленнях пептиду формули (I) даний "будь-який амінокислотний залишок" є залишком аланіну (також названий "A"). В даних втіленнях амінокислотний залишок "X" будь-якого з пептидів формул (Ia)-(Iv) означає "A".

У переважних втіленнях пептид формули (I) обраний із групи, що складається з:

- Nt-SASNKS-Ct (Nt-SEQ ID № 6-Ct),
- Nt-SWANKS-Ct (Nt-SEQ ID № 7-Ct),
- Nt-SWSAKS-Ct (Nt-SEQ ID № 8-Ct) і
- Nt-SWSNKA-Ct (Nt-SEQ ID № 9-Ct).

У переважних втіленнях антигенного пептиду формули (I) Nt (для "N-кінцевої області") складається з пептиду, що включає в себе від 1 до 10 амінокислотних залишків у довжину, який включає від 1 до 5 амінокислотних залишків у довжину. Таким чином, згідно з даними втіленням Nt є пептид, що складається з 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 або 10 амінокислотних залишків у довжину.

У деяких втіленнях Nt включає 5 або 6 амінокислотних залишків у довжину.

У переважних втіленнях пептиду формули (I) Nt включає в себе або в якості альтернативи складається з амінокислотної послідовності NH₂-PWNA-COOH [SEQ ID № 10].

У переважних втіленнях антигенного пептиду формули (I) Ct (для "C-кінцевої області") складається з пептиду, що включає в себе від 1 до 10 амінокислотних залишків у довжину, який включає від 1 до 5 амінокислотних залишків у довжину. Таким чином, згідно з даними втіленням Ct є пептидом, що складається з 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 або 10 амінокислотних залишків у довжину. У деяких втіленнях Ct включає 5 або 6 амінокислотних залишків у довжину.

У переважних втіленнях пептиду формули (I) Ct включає в себе або в якості альтернативи складається з амінокислотної послідовності NH₂-LDDIW-COOH [SEQ ID № 11].

Кожен із Nt і Ct пептидів безпосередньо зв'язаний ковалентним зв'язком з відповідним кінцем пептиду S-X1-X2-X3-K-X4, переважно ковалентного пептидного зв'язку.

У імуногенній композиції згідно винаходу один із Nt або Ct пептидів або обидва з них можуть включати в себе або складатися з полімеру однієї амінокислоти в якості мономеру. Для ілюстрації, даний амінокислотний полімер може складатися з полімеру поліаланіну, поліглутаміну або полілізину.

3 - і/або N-кінцева області пептиду формули (I) можуть відрізнятися від природних послідовностей, точно описаних у даному документі, внаслідок модифікації кінцевої NH₂-групи і/або COOH-групи, і/або модифікації NH₂-групи і/або COOH-групи бічного ланцюга амінокислотного залишку, що знаходяться в ній. Дані групи можуть, наприклад, бути ациліровані, ацетиліровані, амідировані або модифіковані для забезпечення сайту зв'язування для молекули носія.

У переважних втіленнях антигенний пептид обрано із групи, що складається з:

- PWNASASNKSLDDIW (SEQ ID № 12),
- PWNASWANKSLDDIW (SEQ ID № 13),
- PWNASWSAKSLDDIW (SEQ ID № 14) і
- PWNASWSNKA-LDDIW (SEQ ID № 15).

У конкретних втіленнях імуногенної композиції згідно винаходу антигенний пептид формули (I) ковалентно зв'язаний з молекулою-носієм.

Типи молекул-носіїв, що застосовуються для утворення імуногенного продукту, що включає поліпептид формули (I), пов'язаний з молекулою-носієм, добре відомі спеціалісту в даній

області. Функція молекули-носія полягає в тому, щоб забезпечити допомогу цитокіну (або допомогу Т-клітині) для того, щоб підсилити імунну відповідь, спрямовану проти ВІЛ-1.

Молекула-носії, з якою можливо пов'язаний пептид, може бути обрана з широкого різноманіття відомих носіїв. Приклади молекул-носіїв в цілях вакцини охоплюють білки, такі як людський або бичачий сироватковий альбумін, і гемоціанін молюска *Megathura crenulata* (KLH) та жирні кислоти. Інші втілення молекул-носіїв, з якими антигенний пептид формули (I) може бути ковалентно зв'язаний, включають бактеріальні токсини або анатоксини, такі як дифтерійні, холерні, *E.coli* термолабільні і правцеві анатоксини, зовнішній білок мембран *N. meningitidis* (європейська патентна заявка № EP0372501), синтетичні пептиди (європейська патентна заявка № EP0378881 і № EP0427347), білки теплового шоку (заявка РСТ № WO93/17712), білки *Pertussis* (заявка РСТ № WO98/58668), білок D з *H. influenzae* (РСТ заявка № WO00/56360) і токсин А або В з *C. difficile* (Міжнародна патентна заявка WO00/61761).

Будь-яка відповідна реакція кон'югації може бути використана з будь-яким відповідним лінкером, при необхідності. Приклади в даному документі ілюструють втілення імуногенної композиції, де пептиди формули (I) ковалентно пов'язані з молекулою - носієм KLH.

Даний винахід також відноситься до антигенного пептиду формули (I), як описано в даному документі, можливо ковалентно зв'язаний з молекулою-носієм, для застосування в якості лікарського засобу, у тому числі для застосування в якості імуногенного активного інгредієнта лікарського засобу.

Даний винахід також відноситься до антигенного пептиду формули (I), як описано в даному документі, можливо пов'язаний з молекулою-носієм, для застосування в способі попередження і/або лікування інфекції індивідуума, яку викликано вірусом ВІЛ-1.

Даний винахід відноситься до застосування антигенного поліпептиду формули (I), можливо ковалентно зв'язаний з молекулою-носієм, для виготовлення лікарського засобу для запобігання і/або лікування ВІЛ-1-інфікованого індивідуума, тобто для попередження і/або лікування інфекції індивідуума, яку викликано вірусом ВІЛ-1.

Даний винахід відноситься до способу попередження і/або лікування індивідуума, яку інфіковано вірусом ВІЛ-1, тобто для попередження і/або лікування інфекції індивідуума, яку викликано вірусом ВІЛ-1, що включає стадію запровадження даному індивідууму імуногенної композиції, що включає антигенний пептид формули (I), переважно пов'язаний з молекулою-носієм.

У переважних втіленнях імуногенна композиція, яка застосовується згідно винаходу, включає антигенний пептид формули (I) в кількості від 10 нг до 1 мг пептиду формули (I), яке адаптоване для введення індивідууму, що потребує у цьому, для профілактичної або терапевтичної мети.

Кількість антигенного пептиду формули (I), становить від 10 нг до 10 мг, охоплює кількість пептиду формули (I), становить приблизно 20 нг, 30 нг, 40 нг, 50 нг, 60 нг, 70 нг, 80 нг, 90 нг, 100 нг, 150 нг, 200 нг, 250 нг, 300 нг, 350 нг, 400 нг, 450 нг, 500 нг, 550 нг, 600 нг, 700 нг, 800 нг, 900 нг, 1 мкг, 2 мкг, 3 мкг, 4 мкг, 5 мкг, 6 мкг, 7 мкг, 8 мкг, 9 мкг, 10 мкг, 20 мкг, 30 мкг, 40 мкг, 50 мкг, 60 мкг, 70 мкг, 80 мкг, 90 мкг, 100 мкг, 110 мкг, 120 мкг, 130 мкг, 140 мкг, 150 мкг, 160 мкг, 170 мкг, 180 мкг, 190 мкг, 200 мкг, 250 мкг, 300 мкг, 350 мкг, 400 мкг, 450 мкг, 500 мкг, 550 мкг, 600 мкг, 650 мкг, 700 мкг, 750 мкг, 800 мкг, 850 мкг, 900 мкг, 950 мкг і 1 мг.

Кількість пептиду формули (I), який вибрано з групи пептидів SEQ ID № 12, 13, 14 або 15, може становити, приблизно 200 мкг, 500 мкг або 1 мг.

Спеціаліст у даній галузі може легко адаптувати кількість пептиду формули (I) за допомогою проведення рутинних аналізів і визначення діапазону кількості пептиду, який при введенні *in vivo* викликає антитільну відповідь, що блокує інфікування CD4⁺T клітин вірусом ВІЛ-1 і/або блокує поширення вірусу ВІЛ-1 на неінфіковані CD4⁺T клітини, використовуючи відомі аналізи, включаючи один або більше ніж один аналіз, описаний у прикладі даного документа.

Причому, кількість пептиду формули (I) може варіювати в залежності від його амінокислотної довжини і таким чином в залежності від його молекулярної маси, при цьому приймається до уваги, що відношення числа послідовностей "S-X1-X2-X3-K-X4" до маси пептиду формули (I) варіює з довжиною Ct і Nt пептидів, що знаходяться в даному пептиді формули (I), і таким чином варіює з молекулярною масою даного пептиду.

Також, у переважних втіленнях, де антигенний пептид формули (I) пов'язаний з молекулою-носієм, і де пацієнту вводять імуногенну композицію, що включає в себе або складається з даного пептиду формули (I), пов'язаного з даною молекулою-носієм, кількість імуногенного пептиду, що підлягає введенню, може варіювати в залежності від (i) молекулярної маси пептиду формули (I), так і (ii) молекулярної маси молекули-носія, яку застосовують.

Кількість імуногенного з'єднання, яке підлягає введенню індивідууму, легко визначається або адаптується спеціалістом в даній області, який в першу чергу керується діапазоном ефективної кількості пептиду формули (I), який включає діапазон ефективної кількості пептиду формули (I), який вибрано з групи, що складається з SEQ ID № 12-15, і потім молекулярною масою імуногенного з'єднання, яке він збирається вводити.

У деяких втіленнях кількість імуногенного пептиду, що підлягає введенню, може становити приблизно 0,1 мкг, 0,5 мкг, 1 мкг, 5 мкг, 10 мкг або 20 мкг даного імуногенного з'єднання.

Кількість пептиду формули (I) може становити не більше 10000 мкг пептиду формули (I).

Кількість пептиду формули (I), який описано вище, також застосовується, коли даний пептид формули (I) кон'югований з молекулою-носієм, в імуногенній композиції згідно винаходу.

Для ілюстрації, при застосуванні для людей, імуногенна композиція, що включає пептид формули (I), кон'югований з молекулою-носієм KLH, може складатися від 0,1 мкг до 50 мкг кон'югата - імуногенного продукту KLH-пептид формули (I).

У даних втіленнях імуногенну композицію вводять щонайменше двічі індивідууму, що потребує цього. В даних втіленнях другу стадію введення імуногенної композиції згідно винаходу проводять у період часу, що становить від 2 тижнів до 6 місяців після стадії першого введення.

У даних втіленнях імуногенну композицію вводять щонайменше три рази індивідууму, що потребує цього. В даних втіленнях другу стадію введення даної імуногенної композиції згідно винаходу проводять у період часу, що становить від 2 тижнів до 6 місяців після стадії першого введення. В даних втіленнях третю стадію введення даної імуногенної композиції проводять у період часу, що становить від 6 місяців до приблизно одного року після стадії першого введення.

У деяких втіленнях дану імуногенну композицію потім знову вводять імунізованому індивідууму, наприклад, в період часу кожні 5 років або в період часу кожні 10 років.

Даний винахід також відноситься до імуногенної композицій, що включає антигенний поліпептид формули (I), як описано в даному документі.

У даних втіленнях антигенний пептид формули (I) ковалентно зв'язаний з молекулою-носієм.

У даних втіленнях імуногенна композиція згідно винаходу додатково складається з одного або більше ніж одного імуноад'юванта.

Імуногенну композицію, яку визначено в даному документі, що включає імуногенний продукт, який включає в себе пептид формули (I), переважно імуногенний продукт, що складається з кон'югату, який утворено між даним пептидом формули (I) і молекулою-носієм, і яка додатково складається з одного чи більш ніж одного з'єднання імуноад'юванта, у даному описі можна також назвати "вакциною композицією".

У деяких втіленнях не існує конкретної відмінності, яку можна було б зробити між імуногенною композицією згідно винаходу і вакциною композицією згідно винаходу, крім термінів, які використовуються для визначення таких композицій.

Точніше, імуногенна композиція націлена на утворення антитіл, спрямованих проти пептиду формули (I), коли її вводять в організм ссавця, наприклад, миші, кролику, вівці, коню чи кози, в ситуаціях, коли не припускають, що утворені антитіла надають попереджувальну або терапевтичну дію в імунізованому організмі ссавця. Імуногенні композиції згідно винаходу можна використовувати для отримання антитіл, спрямованих проти пептиду формули (I), для додаткового нетерапевтичного застосування даних антитіл, наприклад, в якості реагенту для виявлення вірусу ВІЛ-1 або реагенту для виявлення ВІЛ - похідного пептиду.

З іншого боку, вакцинна композиція згідно винаходу націлена на утворення антитіл, спрямованих проти пептиду формули (I) в організмі ссавця, яким вводять дану вакцинну композицію, в ситуаціях, коли не припускають, що утворені антитіла надають попереджувальну або терапевтичну дію в імунізованому організмі ссавця.

Імуноад'юванти охоплюють, але не обмежуються Stimulon™, QS-21 (Aquila Biopharmaceuticals, Inc., Framingham, Mass.); MPL™ (3-O-деацильований монофосфорилліпід A; Corixa, Hamilton, Mont.), 529 (з'єднання аміноалкілглюкозамінфосфат, Corixa, Hamilton, Mont.), IL-12 (Genetics Institute, Cambridge, Mass.); GM-CSF (Immunex Corp., Seattle, Wash.); N-ацетил-мураміл-L-треоніл-D-ізоглутамін (thr-MDP); N-ацетил-нормураміл-L-аланіл-D-ізоглутамін (CGP 11637, що називається nor-MDP); N-ацетилмураміл-L-аланіл-D-ізоглутамін-L-аланін-2-(1'-2'-дипальмітоіл-sn-гліцеро-3-гідроксофосфорилокси-етиламін) (CGP 19835A, що називається MTP-PE); і холерний токсин. Інші імуноад'юванти або сполуки, які можна застосовувати, охоплюють нетоксичні похідні холерного токсину, включаючи його субодиницю A і/або кон'югати, або генетично сконструйовані злиття поліпептиду N. Meningitidis з холерним токсином або його субодиницею ("СТВ"), термоінактивовані агрегат холерного ентеротоксину, полісахариди

грибів, що включають шизофілан, мурамідипептид, похідні мурамідипептиду ("MDP"), складні форболові ефіри, термолабільний токсин E. coli, блокполімери або сапоніни.

Для ілюстрації, приклади в даному документі ілюструють вакцинну композицію, що включає в себе (i) кон'югат, утворений між KLN і пептидом формули (I), в якості імуногенного продукту і (ii) повний ад'ювант Фрейнда як імуноад'юванта.

Склад таких імуногенних композицій добре відомий спеціалістам в даній області. Імуногенні композиції з винаходу переважно включають фармацевтично прийнятний носій. Відповідні фармацевтично прийнятні носії і/або розріджувачі включають будь-які і всі традиційні розчинники, диспергуюче середовище, наповнювачі, тверді носії, водні розчини, покриття, антибактеріальні та протигрибкові агенти, ізотонічні агенти, і ті що затримують абсорбцію, тощо. Відповідні фармацевтично прийнятні носії включають, наприклад, один чи більш ніж один носій, вибраний з води, фізіологічного розчину, фосфатно-сольового буферного розчину, декстрози, гліцерину, етанолу тощо, а також їх комбінації. Фармацевтично прийнятні носії можуть додатково включати малу кількість допоміжних речовин, таких як зволожуючі або емульгуючі агенти, консерванти або буфери, які збільшують термін придатності при зберіганні або ефективність антитіла. Отримання і застосування фармацевтично прийнятних носіїв добре відомо з рівня техніки. За винятком випадків, коли будь-яке звичайне середовище або агент є несумісним з активним інгредієнтом, передбачається їх застосування в імуногенних композиціях згідно даного винаходу.

Такі імуногенні композиції можна вводити парентерально, наприклад, за допомогою ін'єкції, або під шкіру або внутрішньом'язово, а також перорально або інтраназально. При інших способах введення, наприклад, поміж іншого використовують пероральні композиції, інгаляційні композиції, супозиторії та трансдермальне застосування. Пероральні композиції, наприклад, включають такі, які зазвичай використовують ексципієнти, такі, наприклад, як фармацевтичного ступеня чистоти маніт, лактоза, крохмаль, магнію стеарат, натрію сахарин, целюлоза, карбонат магнію тощо, крім іншого.

Даний винахід також відноситься до вакцинної композиції, що включає антигенний пептид формули (I), описаний у даному документі, в комбінації з одним чи більш ніж одним з'єднанням імуноад'юванта.

Даний винахід також відноситься до вакцинної композиції, що включає (i) імуногенний продукт, що включає в себе пептид формули (I), який об'єднаний з (ii) одним чи більш ніж одним з'єднанням імуноад'юванта.

Як правило, імуногенна або вакцинна композиція згідно винаходу включає 1, 2, 3, 4 або найбільше 5 різних сполук імуноад'юванта.

У переважних втіленнях імуногенна або вакцинна композиція згідно винаходу включає 1 або 2 різних з'єднання імуноад'юванта.

В деяких переважних втіленнях імуногенної або вакційної композиції антигенний пептид формули (I) обраний із групи, що складається з:

- Nt-SASNKS-Ct (Nt-SEQ ID № 6-Ct),
- Nt-SWANKS-Ct (Nt-SEQ ID № 7-Ct),
- Nt-SWSAKS-Ct (Nt-SEQ ID № 8-Ct) і
- Nt-SWSNKA-Ct (Nt-SEQ ID № 9-Ct),

В деяких переважних втіленнях імуногенної або вакційної композиції антигенний пептид формули (I) обраний із групи, що складається з:

- PWNASASNKSLDDIW (SEQ ID № 12),
- PWNASWANKSLDDIW (SEQ ID № 13),
- PWNASWSAKSLDDIW (SEQ ID № 14) і
- PWNASWSNKALDDIW (SEQ ID № 15).

В деяких переважних втіленнях антигенний поліпептид формули (I) ковалентно зв'язаний з молекулою-носієм.

Даний винахід також відноситься до антигенного пептиду формули (I), як детально описано в даному описі, як активний агент вакційної композиції, яка спрямована на попередження і/або лікування ВІЛ-1-інфікованого індивідуума.

Загалом, даний винахід також відноситься до пептиду формули (I) per se, як детально описано в даному описі.

Антитіла, спрямовані проти пептиду формули (I)

Як докладно обговорювали і експериментально проілюстрували в даному документі, імунізація індивідуума імуногенною композицією, що включає пептид формули (I), викликає виробництво нейтралізуючих антитіл проти ВІЛ-1 широкого спектру дії. Дані нейтралізуючі

антитіла проти ВІЛ-1 широкого спектру дії можна застосовувати самі по собі в якості активних агентів проти ВІЛ-1.

Антитіла, спрямовані проти пептиду формули (I), можна застосовувати для попередження ВІЛ-1 або в терапевтичних цілях щодо ВІЛ-1, а також в цілях діагностики ВІЛ-1.

5 У деяких втіленнях антитіла, які спрямовані проти пептиду формули (I), складаються з антитіл, що утворено після імунізації ссавця, включаючи людину, імуногенною композицією, що включає пептид формули (I), як описано в даному документі.

У деяких втіленнях антитіла, спрямовані проти пептиду формули (I), отримують з ВІЛ-1 інфікованих індивідів, у яких було викликано імунну відповідь на ВІЛ-1.

10 В обох втіленнях, наведених вище, дані антитіла можна отримувати за допомогою очищення зразка, головним чином зразка крові, взятої у даного ссавця, у тому числі в даної людини.

В обох втіленнях, наведених вище, дані антитіла можна також отримувати за допомогою клонування даних ДНК у якості матеріалу, що кодує їх, наприклад, починаючи з В-клітин, які отримано з даного ссавця, у тому числі з даної людини.

15 В обох втіленнях, наведених вище, дані антитіла можна також отримувати за допомогою визначення послідовностей амінокислотних залишків даних антитіл, які було зібрано у даного ссавця, в тому числі з даної людини, і потім синтезу молекули ДНК, що кодує дане антитіло або його частину, що включають в себе його CDR (гіперваріативна область), для отримання відповідних рекомбінантних антитіл, що спрямовано проти пептиду формули (I).

20 Даний винахід також відноситься до антитіл, які спрямовано проти пептиду формули (I), як описано в даному документі.

У деяких переважних втіленнях дані антитіла спрямовані проти пептиду формули (I), який вибрано з групи, що складається з:

- Nt-SASNKS-Ct (Nt-SEQ ID № 6-Ct),
- 25 - Nt-SWANKS-Ct (Nt-SEQ ID № 7-Ct),
- Nt-SWSAKS-Ct (Nt-SEQ ID № 8-Ct) і
- Nt-SWSNKA-Ct (Nt-SEQ ID № 9-Ct)

В деяких інших переважних втіленнях дані антитіла спрямовано проти пептиду формули (I), вибраного з групи, що складається з:

- 30 - PWNASASNKSLDDIW (SEQ ID № 12),
- PWNASWANKSLDDIW (SEQ ID № 13),
- PWNASWSAKSLDDIW (SEQ ID № 14) і
- PWNASWSNKA-LDDIW (SEQ ID № 15).

Отримання антитіл, спрямованих проти пептиду формули (I), за допомогою імунізації імуногенною композицією, що включає в себе пептид формули (I), переважно, які описано в прикладах даного документа. В якості альтернативи, антитіла, спрямовані проти пептиду формули (I), можна розглядати від ВІЛ-1 інфікованих пацієнтів, у яких вже є в нормі такі антитіла; їх можна також отримувати після іморталізації людських В - лімфоцитів, презентування їх; їх кДНК (комплементарна ДНК) можна також клонувати і застосовувати

40 додатково для їх презентування або їх похідних за допомогою технології рекомбінантних ДНК. Даний винахід також відноситься до застосування антитіл проти ВІЛ-1, отриманих із індивідуума, імунізованих імуногенною композицією, що описано в даному документі, для виготовлення лікарського засобу для запобігання і/або лікування ВІЛ-1 інфікованого індивідуума.

45 Термін "антитіло" у даному документі застосовується для того, щоб посилатися на молекулу, яка має відповідну специфічність зв'язування антигену. Спеціалісти в даній області швидко розуміють, що даний термін може також охоплювати поліпептиди, які є фрагментами або похідними антитіл, які ще можуть показувати таку ж або дуже схожу функціональність. Такі фрагменти антитіл або похідні, як мається на увазі, в даному контексті охоплені терміном

50 антитіло. Під "антитілом" або "молекулою антитіла" для мети пасивної імунотерапії в даному документі мається на увазі не тільки цілі молекули імуноглобуліну, але також його фрагменти, такі як Fab, F(ab')₂, Fv і інші його фрагменти, які зберігають нейтралізуючу активність проти ВІЛ-1 вірусів. Схожим чином, термін антитіло включає генетично сконструйовані похідні антитіл, такі як молекули одноланцюгового Fv (ScFv) і доменні антитіла (dAb).

55 Виготовлення композицій, що складається з очищених антитіл в пептиді формули (I), як описано в даному документі в прикладах. У деяких втіленнях антитіло в пептиді формули (I) включає поліклональне антитіло. Отримання композиції, що складається з очищених поліклональних антитіл в пептиді формули (I), як описано в прикладах даного документа.

Термін "моноклональне антитіло" застосовується в даному документі для того, щоб охопити всі виділені антитіла, такі як традиційне моноклональне антитіло, що презентується гібридами, а також для того, щоб охопити виділені моноспецифічні антитіла, що презентується будь-якою клітиною, такі як, наприклад, зразок ідентичних людських імуноглобулінів, експресованих в

клітинній лінії ссавців.

Варіабельні важкі (V_H) і варіабельні легкі (V_L) домени антитіла залучені до розпізнавання антигену, факт вперше визнаний внаслідок ранніх експериментів по протеолітичному розщепленню. Додаткове підтвердження виявили за допомогою "гуманізації" антитіл гризунів. Варіабельні домени гризунів за походженням можуть бути злиті з константними доменами людського походження, так що отримане в результаті антитіло зберігає специфічність відносно антигену антитіла, який походить від гризуна (Morrison et al. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 6851-6855). Те, що специфічність по відношенню до антигену надається варіабельними доменами і не залежить від константних доменів, як відомо з експериментів, які включають бактеріальну експресію фрагментів антитіл, причому всі включають один чи більш ніж один варіабельний домен. Дані молекули включають Fab-подібні молекули (Better et al (1988) Science 240, 1041); Fv молекули (Skerra et al (1988) Science 240, 1038); молекули одноланцюгового Fv (ScFv), де V_H і V_L домени-партнери пов'язані за допомогою гнучкого олігопептиду (Bird et al (1988) Science 242, 423; Huston et al (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 5879), і одностановні антитіла (dab), що включають одиничні V домени (Ward et al (1989) Nature 341, 544). Загальний огляд способів, які залучені в синтез фрагментів антитіл, які зберігають свої специфічні сайти зв'язування, можна знайти в Winter & Milstein (1991, Nature 349, 293-299).

Під "молекулами ScFv" маються на увазі молекули, де V_H і V_L домени-партнери пов'язані за допомогою гнучкого олігопептиду. Сконструйовані антитіла, такі як антитіла ScFv, можна отримувати, використовуючи методики і підходи, описані в J. Huston et al, (1988) "Protein antibody engineering of binding sites: recovery of specific activity in an anti-digoxin single chain Fv analogue produced in E. coli", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, pp. 5879-5883, і в A. Pluckthun, (1991) "Antibody engineering; Advances from use of E. coli expression systems", Bio/technology 9 (6): 545-51, які включено в даний документ шляхом посилання.

Відповідні моноклональні антитіла, які є реактивними, як описано в даному документі, можна отримувати за допомогою відомих методик, наприклад, методик, які описано в "Monoclonal Antibodies; A manual of techniques", H Zola (CRC Press, 1988) і в "Monoclonal Hybridoma Antibodies: Techniques and Application", S G R Hurrell (CRC Press, 1982).

Додаткове втілення охоплює гуманізовані антитіла, де області мишачого антитіла, які контактували з антигеном, гіперваріабельні області (CDR), переносили в каркас людського антитіла. Такі антитіла майже повністю людські і рідко викликають будь-які шкідливі відповіді антитіл при введенні пацієнтам. Кілька химерних або гуманізованих антитіл було зареєстровано як терапевтичні лікарські засоби і зараз широко використовуються при різних показаннях (Borrebaeck & Carlsson, 2001, Curr. Opin. Pharmacol. 1: 404-408).

Переважно, коли антитіло є гуманізованим антитілом. Належним чином отримані нелюдські антитіла можуть бути "гуманізованими" відомими способами, наприклад, за допомогою вставки CDR областей мишачих антитіл в каркас людських антитіл. Гуманізовані антитіла можна створювати, використовуючи методики і підходи, описані в Verhoeven et al (1988) Science, 239, 1534-1536 і в Kettleborough et al, (1991) Protein Engineering, 14 (7), 773-783.

Інші втілення антитіл охоплюють повністю людські антитіла, які можна отримувати, використовуючи технології рекомбінантних ДНК. Переважно застосовують великі бібліотеки, що включають мільярди різних антитіл. На відміну від попередніх методик, що використовують химеризацію або гуманізацію, наприклад, мишачих антитіл, дана технологія не ґрунтується на імунізації тварин для отримання специфічного антитіла. Замість цього, рекомбінантні бібліотеки включають величезне число попередньо створених варіантів антитіл, де ймовірно, бібліотека буде включати принаймні одне антитіло, специфічне для будь-якого антигену.

При пасивному лікуванні ВІЛ-1 інфекції, як наведено в даному документі, антитіла по даному винаходу будуть вводити, переважно, внутрішньовенно пацієнтам, які потребують цього. Частота введення може бути визначена клінічно за допомогою нижчеописаного зменшення титрів антитіл у сироватці пацієнтів з часом, але в будь-якому випадку може відбуватися з частотою від 1 до 52 раз в рік, і найбільш переважно між 1 і 12 разів на рік. Кількість антитіл може варіювати відповідно до тяжкості захворювання або часу напівжиття антитіла в сироватці, але переважно буде знаходитися в інтервалі від 1 до 10 мг/кг пацієнта і переважно в інтервалі від 1 до 5 мг/кг пацієнта і найбільш переважно від 1 до 2 мг/кг пацієнта.

Способи та набори для діагностики, прогнозування, здійснення контролю за ВІЛ-1

Як описано в прикладах даного документа, антитіла, які спрямовано проти пептиду формули (I), можна виявити у пацієнтів, інфікованих ВІЛ-1.

Отже, пептид формули (I), може бути використаний в якості виявлення реагенту для визначення наявності і при необхідності кількості антитіл, які спрямовано проти даного пептиду, в індивідуума, який обстежується.

Даний винахід відноситься до способу детектування і/або кількісного визначення антитіл, спрямованих проти пептиду формули (I) у зразку, що включає наступні стадії:

а) приведення зразка, що підлягає тестуванню, у контакт з одним чи більш ніж одним пептидом формули (I), і

б) детектування і/або кількісна оцінка формування комплексів між даними пептидами формули (I) і антитілами, які присутні у даному зразку.

Даний винахід також відноситься до набору для детектування і/або кількісного визначення антитіл, спрямованих проти пептиду формули (I), у зразку, що включає в себе:

а) один або більше ніж один пептид формули (I) і

б) один або більше ніж один реагент для детектування комплексів, які утворено між даними пептидами і антитілами, які присутні у даному зразку.

У деяких втіленнях зразок, що підлягає тестуванню, складається із зразка, який попередньо зібрано у індивідуума, який включає (i) індивідуум з підозрою на інфекцію, викликану вірусом ВІЛ-1, і (ii) індивідуум, який був інфікований вірусом ВІЛ-1.

У деяких втіленнях даний зразок складається з препарату, який ймовірно включає антитіла, спрямовані проти пептиду формули (I), такого як (i) препарат антитіл, очищених із зразків, які зібрано у ссавця, імунізованого імуногенною композицією, що включає пептид формули (I), і (ii) препарат моноклональних антитіл або рекомбінантних антитіл, які спрямовано проти пептиду формули (I).

У деяких втіленнях наведеного вище способу детекції пептид(и) формули (I) іммобілізовано(і) на підкладці.

У деяких втіленнях пептид формули (I) можна застосовувати у якості реагенту для діагностування інфекції індивідуума, яку викликано вірусом ВІЛ-1.

Таким чином, даний винахід також відноситься до способу діагностики інфекції, яку викликано вірусом ВІЛ-1, у індивідуума, що включає наступні стадії:

а) приведення зразка, який зібрано у даного індивідуума, контакт з одним чи більш ніж одним пептидом формули (I), і

б) детектування утворення комплексів між даними пептидами формули (I) і антитілами, які присутні у даному зразку.

У деяких втіленнях стадії б) способу комплекси, утворені даними пептидами формули (I) і антитілами, у разі присутності, визначають кількісно.

Даний винахід також відноситься до набору для діагностики інфекції, викликаной вірусом ВІЛ-1, у індивідуума, який включає в себе:

а) один або більше ніж один пептид формули (I) і

б) один або більше ніж один реагент для детектування комплексів, які утворено між даними пептидами формули (I) і антитілами, що присутні в зразку, який зібрано з даного індивідуума.

У деяких втіленнях способу діагностики або вищеописаного набору для діагностики даний пептид(и) формули (I) іммобілізовано(і) на підкладці, як це описано додатково у даному описі.

Відповідно до вищеописаного способу ВІЛ-1 інфекцію визначають, якщо детектують утворення комплексів, які утворені між пептидом(ами) формули (I) і антитілами, що включені в зразок, які зібрано раніше у індивідуума, що обстежується.

Відповідно до вищеописаного способу діагностики рівень імунної відповіді ВІЛ-1-інфікованого індивідуума на вірус ВІЛ-1 визначають за допомогою кількісного визначення комплексів, що утворено між пептидом(ами) формули (I) і антитілами, які присутні у зразку, які зібрано раніше у індивідуума, що обстежується.

У деяких втіленнях пептид формули (I) можна застосовувати у якості реагенту для здійснення прогнозування розвитку інфекції індивідуума, яку викликано вірусом ВІЛ-1.

Таким чином, даний винахід відноситься до способу прогнозування розвитку інфекції, яку викликано вірусом ВІЛ-1, у індивідуума, що включає наступні стадії:

а) приведення зразка, зібраного у даного індивідуума, в контакт з одним або більш ніж одним пептидом формули (I), і

б) детектування і кількісне визначення утворення комплексів між даними пептидами формули (I) і антитілами, які перебувають у даному зразку.

Даний винахід також відноситься до набору для прогнозування у індивідуума розвитку інфекції, яку викликано вірусом ВІЛ-1, яка включає:

а) один або більш ніж один пептид формули (I) і

б) один або більш ніж один реагент для детектування комплексів, які утворено між даними пептидами формули (I) і антитілами, які присутні в зразку, який зібрано у даного індивідуума.

Відповідно до вищеописаного способу ВІЛ-1 інфекцію визначають, якщо детектують утворення комплексів між пептидом(ами) формули (I) і антитілами, що присутні в зразку, взятому раніше у індивідуума, який обстежується.

Відповідно до вищеописаного способу прогнозування, рівень імунної відповіді ВІЛ-1 інфікованого індивідуума на ВІЛ-1-вірус визначають на стадії б).

При здійсненні вищеописаного способу прогнозування сприятливий результат очікують, коли на стадії б) визначають високий рівень антитіл до поліпептиду формули (I). І навпаки, несприятливий результат очікують, коли на стадії б) визначають низький рівень антитіл до поліпептиду формули (I).

У даному контексті "високий" рівень антитіл до пептиду формули (I), визначають шляхом порівняння з одним чи більш ніж одним еталонним значенням.

У деяких втіленнях вищеописаного способу прогнозування сприятливого результату може бути визначено, якщо в зразку, раніше взятому у даного ВІЛ-1 інфікованого індивідуума, детектують наявність антитіл до поліпептиду формули (I), оскільки, як показано в прикладах даного документа, що індивідууми, у яких включено сироваткові антитіла до пептиду формули (I), як виявили, володіють хорошими клінічними показниками, такі як низьке вірусне навантаження і високу кількість клітин CD4⁺T.

Вищеописаний спосіб діагностики, вищеописаний спосіб прогнозування, а також набори для здійснення даних способів, які можна застосовувати для здійснення контролю за ефективністю спрямованого проти ВІЛ-1 терапевтичного лікування індивідуума, якого інфіковано ВІЛ-1.

Даний винахід відноситься до способу здійснення контролю за спрямованим проти ВІЛ-1 терапевтичним лікуванням ВІЛ-1 інфікованого індивідуума, що включає стадії:

а) проведення курсу лікування проти ВІЛ-1 для даного ВІЛ-1-інфікованого індивідуума і

б) визначення рівня антитіл до пептиду формули (I) у зразку, що взято у даного пацієнта.

У деяких втіленнях способу здійснення контролю рівень антитіл до пептиду формули (I) визначають перед проведенням курсу лікування, що спрямовано проти ВІЛ-1, для даного індивідуума, таким чином, перед стадією а) способу.

У деяких втіленнях способу здійснення контролю, особливо коли лікування, спрямоване проти ВІЛ-1, що включає безліч стадій введення даному індивідууму фармацевтичної композиції проти ВІЛ-1, вищеописаний спосіб здійснення контролю виконують на будь-якій стадії введення або тільки на одній чи більш ніж одній стадії введення, або після останньої стадії введення.

У даному документі описано, що втілення терапевтичного лікування ВІЛ-1 інфекції, за якими можна здійснювати контроль, згідно способу, що вище описано, охоплюють імунізацію ВІЛ-1-інфікованого індивідуума вакцинною композицією, що включає пептид формули (I), як описано в даному документі.

Фрази, такі як "зразок, що включає в себе антитіло" або "детектування антитіла у зразку", не призначені для виключення зразків або визначень (спроб детекції), де не включається або не детектується антитіло. У загальному сенсі, даний винахід включає аналізи для визначення того, чи є у зразку антитіло, що утворюється у відповідь на інфікування і протягом перебігу захворювання, яке викликано вірусом ВІЛ-1, незалежно від того, детектують його чи ні.

Умови для взаємодії пептидів і антитіл, так що вони взаємодіють специфічно, добре відомі спеціалістам в даній області. См., наприклад, Current Protocols in Immunology (Coligan et al., editors, John Wiley & Sons, Inc) або Приклади в даному документі.

Спосіб діагностики включає взяття зразка рідини або тканини організму, які ймовірно включають в себе антитіла. Антитіла можуть бути, наприклад, тип IgG, IgE, IgD, IgM або IgA. Зазвичай виявляють IgM і/або IgA антитіла, наприклад, при виявленні ранньої інфекції. IgG антитіла можуть детектувати, коли деякі з додаткових пептидів, що обговорено вище, застосовують у способі (наприклад, пептиди для детекції білків джгутиків). Зразок переважно такий, що не становить труднощів для його отримання, і він може бути сироваткою або плазмою, яку отримано із зразка венозної крові або навіть при взятті крові з пальця. Тканина з інших частин організму або інші рідини організму, такі як спинномозкова рідина (CSF), слина, шлункова секреція, слиз і т.д., як відомо, включають антитіла і можуть бути використані в якості джерела зразка.

Як тільки пептидний антиген і антитіло зразка отримують можливість взаємодіяти у відповідному середовищі, для визначення наявності або відсутності взаємодії антитіло-пептид проводять аналіз. Серед багатьох типів відповідних аналізів, які будуть очевидними для спеціаліста, є аналізи імунопреципітації і аглютинації.

У втіленнях винаходу аналіз може включати (1) іммобілізацію антитіл(а) у зразку, додавання пептиду по винаходу, а потім детектування рівня антитіла, пов'язаного з пептидом, наприклад, за допомогою мічення пептида або за допомогою додавання міченої речовини (кон'югат, партнер по зв'язуванню), такого як мічене антитіло, яке специфічно розпізнає пептид; (2) іммобілізацію пептиду щодо винаходу, додавання зразка, що включає антитіло(ла), а потім детектування кількості антитіла, який пов'язано з пептидом, наприклад, за допомогою додавання міченої речовини (кон'югат, партнер по зв'язуванню), такого як мічене антитіло, яке специфічно розпізнає антитіло; або (3) взаємодія пептиду і зразка, що включає антитіло(ла) без будь-якого з іммобілізованих реагентів, а потім детектування кількості комплексів антитіла з пептидом, наприклад, за допомогою мічення пептиду або за допомогою додавання міченої речовини (кон'югат, партнер по зв'язуванню), такого як мічене антитіло, яке специфічно розпізнає пептид.

Іммобілізація пептиду щодо винаходу може бути або ковалентною, або нековалентною, а нековалентна іммобілізація може бути неспецифічною (наприклад, неспецифічне зв'язування з поверхнею полістиролу, наприклад, у лунки планшета для мікротитрування). Специфічного або напівспецифічного зв'язування з твердим або напівтвердим носієм, підкладкою або поверхнею можна досягати за допомогою пептиду, що включає, пов'язане з ним, групування, яке дозволяє йому ковалентно або нековалентно зв'язуватися з твердим або напівтвердим носієм, підкладкою або поверхнею. Наприклад, групування може володіти афінністю по відношенню до компоненту, який прикріплено до носія, підкладці або поверхні. У даному випадку, при групуванні може бути, наприклад, біотин або біотиніл групи або їх аналог, пов'язаний з амінокислотою групою пептиду, такий як 6-аміногексанова кислота, а компонентом тоді є авідін, стрептавідін або їх аналог. Альтернативним варіантом є ситуація, в якій угруповання включає амінокислотну послідовність His-His-His-His-His (SEQ ID NO: 17), а носій включає похідне нітрилотриуксусної кислоти (NTA), що заряджене іонами Ni^{++} . Серед відповідних носіїв, підкладок або поверхні можна назвати, наприклад, магнітні кульки або латекс кополімерів, таких як стирол-дивінілбензол, гідроксилірований стирол-дивінілбензол, полістирол, карбоксилірований полістирол, частинки вуглецевої сажі, неактивоване або активоване скло на основі полістиролу або полівінілхлориду, епоксидно-активоване пористе магнітне скло, желатин або частинки полісахариду або інші білкові частинки, еритроцити, моно- або поліклональні антитіла або Fab фрагменти таких антитіл.

Протоколи для імуноаналізів з використанням антигенів для детекції специфічних антитіл добре відомі з рівня техніки. Наприклад, можна застосовувати традиційний аналіз "сендвіч"-типу або можна застосовувати традиційний конкурентний аналіз. Для обговорення деяких підходящих типів аналізів, див. Current Protocols in Immunology (вище). У переважному аналізі пептид щодо винаходу іммобілізований на твердій або напівтвердій поверхні або носії за допомогою ковалентного або нековалентного зв'язування, або до, або після додавання зразка, що включає в себе антитіло.

Пристрої для виконання аналізів специфічного зв'язування, головним чином імуноаналізів, відомі і можуть бути швидко пристосовані для застосування в даних способах. Твердофазні аналізи, загалом, легше виконувати, ніж методи гетерогенного аналізу, які вимагають стадії поділу, такий як преципітація, центрифугування, фільтрація, хроматографія або магнетизм, оскільки розподіл реагентів швидше і простіше. Пристрої для твердофазного аналізу включають планшети для мікротитрування, пристрої для проточного аналізу, тест-смужки та пристрої для імунокапілярного або імунохроматографічного імуноаналіза.

У втіленнях винаходу тверда або напівтверда поверхня або носій є дном або стінкою лунки планшета для мікротитрування; фільтруючої поверхню або мембрану (наприклад, нітроцелюлозна мембрана або мембрана PVDF (полівініліденфторид), така як мембрана Immobilon); порожнисте волокно; гранульоване хроматографічне середовище (наприклад, агарозний або поліакриламідний гель); магнітний мікроносій; волокнисту целюлозну матрицю; ВЕРХ матрицю (високоєфективна рідинна хроматографія); FPLC матрицю (рідинна експрес-хроматографія білків); речовина, що включає молекули такого розміру, що молекули з пептидним зв'язком, будучи розчиненими або розсіяними в рідкій фазі, можуть бути утримані за допомогою фільтра; речовина, здатна утворювати міцели або брати участь в утворенні міцел, даючи можливість рідкій фазі змінюватися і обмінюватися без захвачування міцел; водорозчинний полімер; або будь-який інший відповідний носій, підкладку або поверхню.

У деяких втілень винаходу пептид забезпечений відповідною міткою, яка робить можливою детекцію. Можна застосовувати традиційні мітки, які здатні самі по собі або разом з іншими композиціями або сполуками, забезпечувати детектуючий сигнал. Відповідні способи детекції включають, наприклад, детекцію агента, який є міченим, прямо або побічно, флуоресцентною

міткою за допомогою імунофлуоресцентної мікроскопії, включаючи конфокальну мікроскопію або проточну цитометрію (FACScan); детекцію радіоактивно міченого агента за допомогою авторадіографії; електронну мікроскопію; імунофарбування; субклітинне фракціонування або тому подібне. В одному втіленні радіоактивний елемент (наприклад, радіоактивну амінокислоту) вводять безпосередньо в пептидний ланцюг; в іншому втіленні флуоресцентна мітка асоційована з пептидом через взаємодію біотин/авідін, зв'язок з антитілом, кон'югованим з флуоресцеїном, або тому подібне. В одному втіленні детектуючий специфічний партнер для зв'язування антитіла додають в суміш. Наприклад, партнер зв'язування може бути представленим як детектуюче вторинне антитіло, що зв'язується з первинним антитілом. Дане вторинне антитіло може бути міченим, наприклад, радіоактивною, ферментативною, флуоресцентною, люмінесцентною або іншою детектуючою міткою, такою як система авідін/біотин.

У втіленнях винаходу спосіб детектування включає спостереження за видимим комплексом антитіло-пептид при зміні кольору або спостереження за комплексом антитіло-пептид при фізико-хімічній зміні. Фізико-хімічні зміни можуть відбуватися з реакціями окислення або іншими хімічними реакціями. Їх можна детектувати на око, використовуючи спектрофотометр або тому подібне.

В одному втіленні способу пептид або суміш пептидів піддають електроблотінгу або дот-блотінгу на нітроцелюлозний папір. Після цього, біологічну рідину (наприклад, сироватка або плазма) інкубують з антигеном, підданим блоттингу, і антитілу в біологічній рідині дається можливість зв'язуватися з антигеном(ами). Пов'язане антитіло можна детектувати, наприклад, стандартними імуноферментними методами.

В іншому втіленні способу, латексні кульки кон'югують з антигеном(ами) щодо винаходу. Далі біологічну рідину інкубують з кон'югатом кульку/пептид, з утворенням, таким чином, реакційної суміші. Реакційну суміш потім аналізують для визначення наявності антитіл.

Один переважний аналіз для скринінгу крові продуктів або інших фізіологічних або біологічних рідин є твердофазний імуноферментний аналіз, тобто ELISA. Зазвичай у ELISA виділений антиген(ни) щодо винаходу адсорбується на поверхні лунки планшета для мікротитрування безпосередньо або за допомогою матриці для захоплення (наприклад, антитіло). Залишкові неспецифічні сайти зв'язування білка на поверхні потім блокують відповідним агентом, таким як бичачий сироватковий альбумін (BSA), інактивована нагріванням нормальна сироватка кози (NGS) або BLOTTO (забуферений розчин знежиреного сухого молока, який також містить консервант, солі та піногасник). Потім лунку інкубують з біологічним зразком, що потенційно включає в себе антитіла проти ВІЛ-1. Зразок можна застосовувати нерозведеним, або частіше він може бути розведений, переважно в забуференому розчині, який включає невелику кількість (0,1-5,0 мас. %) білка, такого як BSA, NGS або BLOTTO. Після інкубування протягом достатнього періоду часу для того, що б дозволити відбутися специфічному зв'язуванню, лунку промивають для видалення незв'язаного білка і потім інкубують з оптимальною концентрацією відповідного антитіла до імуноглобуліну (наприклад, у разі суб'єктів, які є людьми, антитіло до людського імуноглобуліну з іншого тваринного, такого як собака, миша, корова тощо), яке кон'юговано з ферментом або іншою міткою за допомогою стандартних способів, і розчинено у блокувальному буфері. Мітку можна вибрати з безлічі ферментів, що включає пероксидазу хрому (HRP), бета-галактозидазу, лужну фосфатазу, глюкозооксидазу і т. д. Надають достатньо часу для того, щоб знову сталося специфічне зв'язування, потім лунку знову промивають для видалення незв'язаного кон'югату і додають відповідний субстрат для ферменту. Дозволяють розвинути забарвлення, та визначають оптичну густину вмісту лунки візуально або інструментально (вимірюють при відповідній довжині хвилі). Граничне значення OD (оптична щільність) можна визначати як середнє OD \pm стандартне відхилення (SD_s) щонайменше 50 зразків сироватки, які зібрано у індивідуумів, які не інфіковані вірусом ВІЛ-1, або за допомогою інших таких традиційних визначень. У разі дуже специфічного аналізу, в якості граничного значення можна використовувати OD+2SD.

В одному втіленні ELISA пептид щодо винаходу мобілізують на поверхні, такий як 96-лунковий планшет ELISA або еквівалентна тверда фаза, яка покрита стрептавідином або еквівалентним біотинзв'язуючим з'єднанням в оптимальній концентрації лужного покриваючого буфера, і інкубують при 4 °C всю ніч. Після відповідного числа промивок стандартними відмивальними буферами в будь-якій лунці використовують оптимальну концентрацію бутильованої форми композиції/антигену з даного винаходу, що розчинено в традиційному блокувальному буфері; додають зразок; і аналіз триває, як описано вище.

Іншим корисним форматом аналізу є формат латерального струму. Антитіло до людського або тваринного антитіла або антитілам до стафілококових білків A і G мітять генератором

сигналу або репортером (тобто колоїдним золотом), яке сушать і розміщують на підкладку зі скловолокна (підкладка для нанесення зразка). Діагностичний пептид іммобілізують на мембрані, такий як мембрана PVDF (полівініліденфторид), (наприклад, мембрана Immobilon (Millipore)) або нітроцелюлозній мембрані. Коли розчин зразка (кров, сироватка і т.д.) наносять на підкладку для нанесення зразка, він розчиняє мічений колоїдним золотом репортер, і він зв'язується з усіма антитілами в зразку. Дану суміш переносять на наступну мембрану (PVDF або нітроцелюлозу, що включає в себе діагностичний пептид) за допомогою капілярного дії. Якщо антитіла до діагностичного пептиду присутні, вони зв'язуються з діагностичним пептидом, що нанесено на мембрану, генеруючи сигнал. Для отримання контрольного сигналу використовують додаткове антитіло, специфічне до антитіла, що мічено колоїдним золотом (таке як антитіло кози проти мишиного IgG).

Спеціалісту в даній галузі слід розуміти, що можна спланувати будь-яке число форматів традиційного аналізу білків, переважно форматів імуноаналізу, з використанням виділених пептидів з даного винаходу для детекції у суб'єкта інфекції ВІЛ-1. Даний винахід, таким чином, не обмежується відбором певного формату аналізу, і, як вважають, охоплює формати аналізу, які відомі фахівцям в даній області.

Реагенти для ELISA або інших аналізів згідно даного винаходу можуть бути надані у формі наборів. Такі набори корисні для діагностування інфекції, яку викликає ВІЛ-1 вірусом, з використанням зразка, який зібрано у суб'єкта (наприклад, людини або іншої тварини). Такий набір для діагностики може включати в себе пептид щодо винаходу (і, при необхідності, додаткові пептиди, як обговорюється вище) і можливо систему (засоби, що дозволяють) для детекції пептиду щодо винаходу, пов'язаного з антитілом, спрямованим проти пептиду формули (I), і/або поверхню, з якої пептид може бути пов'язаний. В одному втіленні набір включає суміш відповідних пептидів або засоби для отримання таких сумішей, і/або реагенти для детектування комплексів пептид-антитіло.

Набір може включати в себе планшети для мікротитрування, на яких пептид(и) щодо винаходу були заздалегідь адсорбовані, індій пристрій для відповідного аналізу, різні розчинники та буфери, мічені кон'югати або інші агенти для детекції специфічно пов'язаних антигенів або антитіл, і інші, які генерують сигнал реагенти, такі як субстрати ферментів, кофактори і хромогени. Інші компоненти набору можуть бути легко визначені фахівцем в даній області. Такі компоненти можуть включати реагенти для покриття, поліклональні або моноклональні іммобілізовані антитіла, специфічні для пептиду щодо винаходу, або суміш двох або більше двох антитіл, очищені або напівочищені екстракти даних антигенів в якості стандартів, що ідентифікують MAb антитіла, антитіло до мишиного і людського антитіла з молекулою-індикатором, кон'юговано з ним, планшет ELISA, приготовлено для абсорбції, індикаторні графіки для калориметричних порівнянь, одноразові рукавички, інструкції щодо деконтамінації, смужки-аплікатори або контейнери, посудина для приготування зразка і т.д. В одному втіленні набір включає в себе буфери або інші реагенти, які підходять для складання реакційної суміші, роблячи можливим утворення комплексу пептид-антитіло. Такі набори забезпечують для клінічної лабораторії зручний, ефективний шлях для діагностики інфекції, яку викликає вірусом ВІЛ-1.

У деяких втіленнях способи діагностики і набори, що описано в даному документі, можна застосовувати в основному для визначення наявності антитіл до ВІЛ у зразку, який зібрано раніше у індивідуума. В деяких інших втіленнях способи діагностики і набори, описані в даному документі, можна застосовувати для ідентифікації підродино вірусу ВІЛ-1, яким був інфікований індивідуум, що обстежується в даний час.

У деяких втіленнях способи діагностики і набори, що описано у даному документі, використовується тільки один пептид, який зібрано з пептидів, що належать сімейству пептидів формули (I).

В інших втіленнях способи діагностики і набори, що описано у даному документі, використовується безліч пептидів, які зібрано з пептидів, що належать сімейству пептидів формули (I).

Для ілюстрації, у втіленнях способів діагностики і набору, описаних у даному документі, використовується безліч пептидів формули (I), які вибрано з групи, що складається з:

- PWNASASNKSLDDIW (SEQ ID № 12),
- PWNASWANKSLDDIW (SEQ ID № 13),
- PWNASWSAKSLDDIW (SEQ ID № 14) і
- PWNASWSNKALDDIW (SEQ ID № 15).

Нижче, даний винахід додатково проілюстровано прикладами, але не обмежується ними.

Приклади

Матеріал і Методи

1. Отримання вірусу

Мутантів отримували з плазмиди pNL4.3 з використанням набору QuickChange II XL для сайт-спрямованого мутагенезу (Stratagene) з подальшою перевіркою за допомогою ДНК.

5 Плазмиди pNL4.3 дикого типу і мutowані по аланіну 3S/gp41 трансфікували за допомогою ліпofектаміну (Invitrogen) в клітини 293T в середовищі Optima. Після 48-годинної трансфекції збирали супернатант, який не включає в себе клітин, і визначали концентрацію головного коров'ячого білка ВІЛ р24 з використанням набору Vidas Ag p24 II (Biomerieux). Вірусні супернатанти зберігали при -80 °C.

2. Пептиди і антитіла

Очищені некон'юговані і KLH-кон'юговані синтетичні пептиди дикого типу і мutowані по аланіну 3S/gp41 (Fig. 1) отримували з Covalabs (Villeurbanne, Франція). Мишам двічі внутрішньовенно вводили, з приблизно 2-х тижневим інтервалом між будь-якою ін'єкцією, 20 мг пептиду, пов'язаного з KLH, у присутності неповного ад'юванта Фрейнда. Сироватки титрували за допомогою твердофазного імуноферментного аналізу (ELISA) з використанням планшетів Maxisorp (Nunc), покритих, на ніч при 4 °C, 100 нг пептидів дикого типу або мutowаних по аланіну 3S/gp41, як описано (Vieillard et al AIDS 2006).

3. Очищення вихідних здорових клітин CD4⁺T

Лейкоцити із зразків цільної крові, що взято у здорових донорів, отримували за допомогою центрифугування з утворенням лейкоцитарної плівки з "Etablissement Français du sang" (Hôpital Pitié-Salpêtrière, Париж, Франція). Клітини CD4⁺T очищували за допомогою CD4 магнітних мікрогранул (Miltenyi). Проточний цитометричний аналіз показав чистоту CD4 клітин, що становить понад 95 %. Клітини активували протягом 3 днів 1 мкг/мл PHA-L (Murex) в RPMI-1640 Glutamax середовищі (Invitrogen) з додаванням 10 % фетальної телячої сироватки (FCS) і потім культивували з 100 МО (міжнародні одиниці)/мл пролейкіна-2 (Chiron), що додається кожні 3 дні.

4. Аналіз інфікування

Очищені активовані клітини CD4⁺ T, MT2 і клітин Jurkat (10⁷ клітин) інкубували з 100 нг еквівалентів антигену р24 протягом 17 год. і 2 год. при 37 °C відповідно. Клітини потім промивали двічі в PBS (фосфатно-сольовий буферний розчин)/EDTA (етилендіамінтетраоцтова кислота) і ресуспендіювали до 10⁶/мл. За продукцією вірусу стежили кожні 2 дні після інфікування за допомогою ELISA з вимірюванням концентрації р24 з допомогою набору Vidas Ag p24 II (Biomerieux). Утворення синцитія на інфікованих MT2 клітинах оцінювали після 96 год. за допомогою фазово-контрастної мікроскопії.

5. Одноетапний аналіз інфекційності ВІЛ-1

Hela P4C4, люб'язно подаровані А. Morris і О. Schwartz (Інститут Пастера, Париж, Франція), спільно трансфікували з CD4⁺ і CCR5⁺, і включали інтегровану копію ВІЛ-1 довгого кінцевого повтору (LTR), пов'язаного з геном люциферази і β-галактозидази (Amara et al J. Exp. Med. 1997). Клітини висівали за один день наперододні і інфікували 4 нг р24/мл дикого типу або мutowаних по аланіну 3S/gp41 вірусів NL4.3. Через 48 год. після інфікування вимірювали активність β-галактозидази в клітинних лізатах Hela-P4C5 з використанням набору CPRG Beta-Galactosidase (OZ biosciences).

6. Аналіз нейтралізації

Фракцію поліклональних IgG з антисироваток мишей виділяли з використанням набору Nab Protein A/G Spin і потім висолювали з використанням колонок для висолювання Zeba spin, обидва з Thermo Scientific, згідно інструкцій виробника. Фракції імуноглобуліну концентрували з використанням Centricon Centrifugal Filter Units (Millipore) і потім кількісно визначали з використанням набору BCA protein assay (Thermo Scientific). Очищені Ab тестували при початкових концентраціях 20 мкг/мл з наступними п'ятьма 2-кратними розведеннями.

Людські антитіла до WT або до W614A 3S/gp41 очищали за допомогою імунопреципітації з інактивованим нагріванням плазми інфікованого ВІЛ-1 пацієнта з використанням набору Pierce Direct IP за допомогою прямої імунобілізації синтетичного пептиду на агарозній підкладці з реакційноздатними аміногрупами. Очищені антитіла потім піддавали діалізу проти PBS (Silde-A-Lyser Dialysis cassette, Pierce) і кількісно визначали. Очищені антитіла тестували при початкових концентраціях 2 мкг/мл з наступними п'ятьма 2-кратними розведеннями.

Два аналізи з використанням інфекційних вірусів проводили для аналізу нейтралізації очищених антитіл (Fenyö et al PLoS one 2009):

(1) Для порівняння дієвості (концентрації, що вимагаються для досягнення 50 % [IC₅₀] і 90 % [IC₉₀] інгібування) антитіла, спочатку використовували аналіз "CD4⁺T клітини-р24". Інфекційні реплікуючі компетентні віруси (200TCID₅₀) інкубували з різними концентраціями Ig протягом 30 хв з подальшим додаванням PHA-активованих очищених CD4⁺T клітин у присутності IL2. Сім

днів після ініціації інфекції зразки в двох повторюваннях відбирали для вимірювання p24 (набір Vidas Ag p24 II, Biomerieux).

(2) Для оцінки можливості при розрізненій нейтралізуючій активності різних очищених Ab вимірювали їх здатність інгібувати проникнення ВІЛ-1 у різних штамів Х4 (NL4.3, BRU, NDK) і R5 (JR-CSF, YU-2) або ROD HIV-2 з використанням клітин Hela-P4C5 і/або TZM-bl (NIH AIDS Research and Reference Reagent Program), люб'язно наданих Clarisse Berlioz-Torrent (Institut Cochin, Париж, Франція). Інфекційні реплікуючі компетентні віруси (200TCID₅₀) інкубували з Ig в різних концентраціях протягом 30 хв з подальшим додаванням клітин Hela P4C5. Через 48 год. після інфікування вимірюють β-галактозидазну активність в лізатах Hela-P4C5 з використанням набору CPRG Beta-Galactosidaset (OZ biosciences), а активність люциферази вимірюють в лізатах TZM-bl з використанням Britelite Plus Reagent (Perkin Elmer). Граничне значення 2,5-кратного фону застосовували для визначення позитивних значень в аналізах TCID (доза, що інфікує культуру тканини). Дані виражали в TCID₅₀ і TCID₉₅.

7. Проточна цитометрія

FACS аналіз (сортування флуоресцентно-активованих клітин) проводили на очищених CD4⁺T клітинах у присутності життєздатного або інактивованого нагріванням вірусу протягом 17 годин або оброблених пептидами 3S/grp41 протягом 4 год. при 37 °C. Зразки інкубували з 1 мкг будь-якого антитіла: антитіла до NKp44L або з білками злиття (NKp30-Ig, NKp44-Ig або NKp46-Ig) протягом 2 год. при 4 °C у присутності PBS/BSA1 %. Потім клітини промивали в PBS/BSA1 % та інкубували протягом 30 хв при 4 °C зі специфічними вторинними антитілами (розведеними 1:100 в PBS/BSA1 %), і, нарешті, фарбували безпосередньо mAb проти CD4 і фіксували з використанням розчину BD CellFix (BD Bioscience), як описано (Vieillard et al PNAS 2005). На FACSCanto (BD Biosciences) або Navios (Coulter) детектували щонайменше 10000 подій у клітинах CD4⁺.

8. Аналіз дегрануляції

Неінфіковані CD4⁺T клітини або CD4⁺T клітини, інфіковані диким типом або мутовані по аланіну 3S/grp41 вірусами NL4.3, ресуспендіювали у співвідношенні 1:1 у присутності аутологічних PBMC (мононуклеарні клітини периферичної крові), активованих аутологічними IL2, і mAb проти CD107a (H4A3; Becton Dickinson). Після 1 год. інкубації додавали 3 мМ монензин для додаткових 3 год. інкубації, як описано раніше (Béziat et al PLoS One 2010). NK клітини фарбували mAb проти CD3, проти CD56 і проти NKp44 та аналізували на FACSCanto (BD Biosciences) або Navios (Coulter). Щонайменше аналізували 5000 подій CD3⁺CD56⁺.

Приклад 1: Цілісність 3S/grp41 CD4 при інфікуванні CD4⁺T клітин

Щоб визначити роль мотиву 3S/grp41 в життєвому циклі вірусу, залишки, розташовані між положенням S613 і S618 в межах 3S мотиву білка grp41 із штаму ВІЛ-1 NL4.3, індивідуально вводили одиничні точкові заміни. Для вивчення того, чи включають поодинокі заміни вплив на вірусну інфекційність, клітини MT-2 стимулювали 100 нг еквівалентного антигена р24 з будь-якого вірусного препарату. На Фіг. 2А показано, що впливи, які надаються замінами мотиву 3S/grp41, варіюють від майже повної відмови вірусної продукції до відсутності впливу відносно вірусу, що експресує мотив дикого типу. Дійсно, S613A мутований вірус зберігав свою абсолютну здатність інфікувати MT-2, в той час як K617A все ще показував 66±10 % від рівня, який спостерігається для дикого типу, а інші мутанти - менш ніж 22 %. Очевидно, що W614A і S618A не здатні встановлювати інфекцію у MT-2 клітинах (Фіг. 2А). Ці дані підтверджували здатність даних мутантів здійснювати утворення синцитія з абсолютною відсутністю даних гігантських клітинних структур у клітинах MT-2, інфікованих або W614A і S618A мутованих вірусів, порівняно з диким типом (Фіг. 2Б). Ці дані наводять на думку про те, що обидва положення, W614A і S618A, мотиву 3S/grp41 можуть відігравати критичну роль при вірусній інфекції.

Вивчення кінетики інфікування в очищених CD4⁺T клітинах показало, що дикий тип і S613A і K617A мутанти показали дуже продуктивну реплікацію вірусу (аж до 187 пкг/мл р24) з піком продукції р24, відповідно до 8 днів після інфікування (Фіг. 2В). І навпаки, незалежно від періоду часу, інфекційний рівень S615A і N616A мутованих вірусів залишається дуже низьким, з 13,5 % і 17,3 пкг/мл на піку вірусного навантаження відповідно і залишається невизначеним у разі W614A і S618A (Фіг. 2В). Схожі результати спостерігали у присутності інфікованих клітин Jurkat (дані не показано).

Далі намагалися визначити, на яку стадію вірусного циклу впливала мутація в мотиві 3S/grp41. Для оцінки інфекційності мутантів 3S/grp41 вірусні супернатанти з трансфікованих клітин 293T тестували на індикаторних клітинах Hela P4C5, причому похідна клітинна лінія Hela включала ВІЛ-LTR Лас-Z касету, яку активовано Tat при ВІЛ-1 інфікуванні (Amara et al J Exp Med 1997). Як показано на Фіг. 2Г, як у S613A, так і K617A мутантів зберігається здатність інфікувати

клітини, подібно до дикого типу. І навпаки, у присутності S615A, N616A і S618A мутантів рівень інфекційності щонайменше в 10 разів нижче, ніж у випадку дикого типу та абсолютно невизначений у разі W614A мутанта. Це вказує на те, що специфічні заміни в конкретних положеннях в мотиві 3S/grp41 інгібують надходження вірусу в клітини CD4⁺T.

5 Приклад 2: Точкові мутації в мотиві 3S/grp41 припиняють експресію NKp44L

Як показано раніше іншими авторами винаходу, ВІЛ-1 інфекція індукуює експресію певних NKR лігандів, включаючи NKp44L (Vieillard et al 2005; Ward et al 2007). Хотілося визначити, чи здатний вірус, що включає в себе 3S/grp41 заміни, також викликати експресію NKp44L на очищених клітинах CD4⁺T. Після інфікування вірусом клітини дикого типу з високою частотою експресували NKp44L (56,2 %). Подібні результати були отримані на клітинах CD4⁺T, інфікованих мутантами S613A або K617A, з 61,0 і 67,6 % клітин, що експресують NKp44L, відповідно. Більш цікавий той факт, що експресію не детектували у випадку інших мутантів; W614A, S615A, N616A і S618A. Згідно з попередніми даними (Vieillard et al 2005; Ward et al 2007) експресія лігандів NKp30 і NKp46 не індукувалась в клітинах, які інфіковано або диким типом, або мutowаними по аланіну 3S/grp41 вірусами, незалежно від положення заміни (Фіг. 3A).

Далі досліджували можливість того, що експресія NKp44L по-різному регулюється у відсутності інфекційних частинок. Таким чином, у присутності інактивованого нагріванням вірусу (Фіг. 6A) або після стимуляції синтетичними 3S-пептидами, включаючи різні заміни на аланін в мотиві 3S/grp41 (Фіг. 3B), були отримані результати, схожі з результатами, які отримано у разі компетентного вірусу, при збереженні заміни їх конкретного залишку. Дійсно, експресія NKp44L індукується лише в присутності S613A і K617A мutowаних елементів на рівні, близькому до рівня, що спостерігається у разі дикого типу, тоді як інші неінфекційні частинки або пептиди-мутанти не здатні індукувати NKp44L.

Приклад 3: Модуляція дегрануляції NK клітин у присутності аутологічних CD4⁺T клітин, інфікованих 3S/grp41 мутантами вірусу

Оскільки виявили NKp44L на CD4⁺T клітинах, які інфіковано NL4.3 вірусом, що включає конкретні 3S/grp41 мутації (Фіг. 2A), досліджували можливість того, що клітини-мішені, що експресують даний ліганд, є більш чутливими до цитотоксичних NK. Очищені CD4⁺T клітини, які інфіковані або диким типом, або різними мutowаними вірусами, інкубували з аутологічними IL2-активованими NK клітинами для визначення їх здатності до дегрануляції. На Фіг. 3B показано, що високий рівень експресії CD107a в NKp44L⁺NK клітинах детектували в присутності вірусу дикого типу (28,8 %) або S613A (29,5 %) і K617A (29,9 %) мутантів, порівняно з неінфікованими клітинами (4,2 %) у відповідності з даними, що показують високий рівень експресії NKp44L в CD4⁺T клітинах-мішенях (Фіг. 3A). На відміну від інших мутантів, для яких не спостерігають індукції NKp44L в клітинах CD4⁺T, рівень дегрануляції залишається майже близьким до рівня дегрануляції, що спостерігається у разі неінфікованих клітин (Фіг. 3B). Схожі результати отримували в присутності інактивованих нагріванням вірусних часток (Фіг. 6B) і синтетичних пептидів (Фіг. 4Г).

В цілому, дані результати суворо вказують на те, що заміни специфічних залишків у межах високо консервативного 3S/grp41 мотиву викликають великі наслідки, що стосуються модуляції чутливості клітин-мішеней CD4⁺ до NK клітин.

Приклад 4: Еліситація 3S-подібних нейтралізуючих антитіл широкого спектру дії в мишах

У зв'язку з вищевикладеним проводили імунізацію мишей диким типом і будь-яким мutowаним по аланіну 3S/grp41 пептидом виробляти специфічні антитіла. Для будь-якого з них спостерігали стійкі імунні відповіді на свою специфічну послідовність 3S/grp41 при використанні ELISA з захопленням вільних пептидів (дані не показано). Цікавий той факт, що величина перехресної серологічної реакції залежить від пептидного компонента; причому антисироватка взаємодіє з будь-яким синтетичним пептидом прямо пропорційно своїй здатності індукувати експресію NKp44L. Таким чином, сильну перехресну серологічну реакцію спостерігали між диким типом і S613A і K617A мутантами, тоді як даний ефект сильно знижується з іншими мутантами, у відповідності з передбачуваними конформаційними модифікаціями, що викликані специфічними замінами.

Більше того, цілі імуноглобуліни (Ig) елюювали з будь-якою сироваткою для оцінки їх ефективності та широти дії нейтралізації на крос-кладі R5 і X4 ВІЛ-1 штамів. Використовуючи різні класичні аналізи нейтралізації з використанням клітин TZM-bl і Hela-P4C5, підтвердили присутність значної нейтралізуючої активності антитіл до 3S дикого типу проти ВІЛ-1 (Таблиця 2 і 3), як описано раніше (Vieillard AIDS 2006). Схожі результати спостерігали у присутності очищеного Ig з імунізованих S613A і K617A мутантних мишей. Несподівано, високу нейтралізуючу активність широкого спектру дії детектували для мутантів W614A, S615A, N616A і S618A. Дійсно, значні відповіді були викликані будь-яким із даних мутантів на різні X4 (NL4.3,

BRU, і NDK) і R5 (JR-CSF і YU-2) ВІЛ-1 штами зі значенням IC_{50} , що знаходяться між 3,3 і 17,7 мг Іг/мл (Таблиця 2). Більш того, Іг з W614A здатні нейтралізувати всі тестовані Х4 і R5 ВІЛ-1 штами зі значенням IC_{95} , що знаходяться між 6,7 і 19,5 мкг/мл в клітинах Hela-P4C5 (Таблиця 2) і між 3,9 і 10,3 мкг/мл в клітинах TZM-bl (Таблиця 3), в залежності від вірусів. Як і очікувалося, у

5 присутності штаму ВІЛ-2 (ROD) нейтралізуючу активність не детектували, незалежно від стану (Таблиця 3), що узгоджується зі специфічною делецією мотиву 3S/gp41 в послідовностях штаму ВІЛ-2 (Vieillard PNAS 2005).

Для остаточного підтвердження вищевказаних даних визначали ефективність вірусної нейтралізації за допомогою детекції продукції р24 очищених клітин $CD4^{+}T$, інфікованих NL4.3 або NDK штамами ВІЛ-1. На Фіг. 4А підтверджується відсутність нейтралізуючої активності проти NL4.3, що викликається Іг з WT або мутантів S613A і K617A, незалежно від їх концентрації. І навпаки, значне зниження продукції р24 спостерігали у присутності Іг з мутантів W614A, S615A, N616A і S618A. Цікаво те, що при концентрації, що перевищує 10 мкг/мл Іг з W614A, антиген р24 залишається невизначеним. Схожі результати спостерігали після

15 інфікування NDK (Фіг. 4А). Крім того, вивчення кінетики показало, що продукція р24 повністю припиняється при 10 мкг/мл Іг з мутанта W614A, незалежно від часу після інфікування і значно затримується у разі Іг з S615A, N616A і S618A мутантів, порівняно з диким типом і мутантами S613A і K617A (Фіг. 4Б). Загалом, вищевказані дані повністю підтверджують, що заміна в конкретних положеннях в високо консервативному мотиві 3S/gp41 викликала утворення

20 нейтралізуючої активності широкого спектру дії в мишах.

Для додаткової оцінки ефективності інгібування NKp44L, що здійснюються Іг, очищеним з мутантів 3S/gp41 по аланіну, очищені клітини $CD4^{+}T$ від здорових донорів інкубували з пептидом 3S/gp41 дикого типу, попередньо обробленим очищеним Іг з імунізованих мишей. На Фіг. 4В показано, що 3S-індукована експресія NKp44L значно знижується в присутності Іг із 3S-WT (9,4 %), порівняно з контрольними клітинами (35,5 %), що відповідає попереднім даним, отриманим з mAb проти 3S дикого типу (Vieillard et al PNAS 2005). Крім того, сильне інгібування експресії NKp44L також спостерігали у присутності 3S/gp41 мутантів по аланіну, але трохи

25 більш виражене у разі Іг з S613A і K617A, ніж W614A, S615A, N616A і S618A мутантів (Фіг. 4Б). Вищевказані результати узгоджуються з даними по дегрануляції IL-2-активованих NK клітин стосовно аутологічних клітин $CD4^{+}T$, які оброблено 3S-пептидом у присутності антитіл з WT або мутантів 3S/gp41 по аланіну. Таким чином, дегрануляція інгібувалась як у WT на 91,4 %, так і в мутантів 3S/gp41 по аланіну на $78,3 \pm 4,8$ %, незалежно від положення заміни (Фіг. 4Г). Це показало, що Іг, утворені у відповідь на 3S/gp41 пептид зі специфічними замінами, набувають нейтралізуючу здатність широкого спектру дії при захисті, роблячи можливим інгібування експресії NKp44L в $CD4^{+}T$ клітинах.

30

Приклад 5: Nab широкого спектру дії проти W614A 3S мутанта в плазмі від ВІЛ-1-інфікованих пацієнтів

Нещодавно показали, що активність реакційноздатних Nab широкого спектру дії, очевидно, що розвивається з часом у ВІЛ-1 - інфікованих пацієнтів. Для отримання інформації по частоті, з якою індукується утворення bNab до заміщеного 3S/gp41 мотиву, при ВІЛ інфекції, проаналізували нейтралізуючу активність у 106 зразках плазми крові, які отримано від ВІЛ-1-інфікованих пацієнтів із різним клінічним станом. Зі 106 оцінених зразків 55/106 (52 %) включали в себе рівень антитіл, такий що виявляється до 3S-WT зі значеннями, що знаходяться в інтервалі між 15 і 325 AU (оптична одиниця)/мл Тест Спірмена показує високо значущий

40 взаємозв'язок між кількістю антитіл до 3S і числом $CD4$ клітин ($p < 0,0001$) (дані не показані), як описано (Vieillard et al AIDS 2006). Несподівано, антитіла, специфічно спрямовані проти W614A мутантного мотиву 3S/gp41, детектували у 5 з 106 зразках плазми (4,7 %) за допомогою ELISA. Для будь-якого з них високий рівень антитіл був детектованим (знаходиться між 120 і 250 AU/мл). Дані специфічні антитіла є ізотипами IgG (дані не показані), і їх винятково детектували у

45 пацієнтів з високим числом $CD4$ (822 ± 89 $CD4/mm^3$), і недетектованим вірусним навантаженням (нижче ніж 20 копій/мл) (Таблиця 3). Слід зазначити, що дані антитіла, специфічно спрямовані проти W614A мутантного 3S/gp41 мотиву, не є детектованим в плазмі здорових донорів (дані не показані), а також антитіла до мотиву дикого типу (Vieillard et al AIDS 2006).

Зразки плазми від даних 5 незвичайних пацієнтів досліджували, і рівні нейтралізації, виражені як кратність розведення плазми, показали нейтралізуючу активність проти ВІЛ крос-клади для всіх даних зразків плазми, з $IC_{50} > 100$ для всіх із них, у присутності Х4 NL4.3 і R5 YU-2 вірусів. Цікаво, що плазма в 1 із даних пацієнтів (#109) нейтралізувала щонайменше 95 % ВІЛ часток (Таблиця 3). Для підтвердження того, що нейтралізуюча активність пов'язана з антитілом, специфічно спрямованим проти W614A 3S/gp41 мутантного мотиву, антитіла з сироваток 5 ВІЛ-інфікованих пацієнтів очищали імуносорбційним методом з відповідним

50

60

синтетичним пептидом. Дані елюйовані антитіла показують значну нейтралізуючу активність з IC_{50} значеннями, що знаходяться в інтервалі між $<0,2$ і $1,9$ мкг/мл або $<0,2$ і $1,9$ мкг/мл, у клітинах Hela-P4C5 і TZM-bl відповідно, для щонайменше двох різних ВІЛ-1 штамів (Таблиця 3). Вражаючи, очищені антитіла від 1 з 5 пацієнтів (#109) показують подібну широту нейтралізуючої активності проти всіх X4 і R5 штамів ВІЛ з IC_{95} , що знаходиться між $0,6$ і $1,9$ мкг/мл, незалежно від аналізу нейтралізації (Таблиця 3). Вищевказані дані підтверджували продукцією р24 на очищених $CD4^+T$ клітинах, що показують сильну нейтралізуючу активність, що змінюється між $0,2$ і $1,0$ мкг/мл і $0,11$ і $1,8$ мкг/мл після інфікування NL4.3 і NDK відповідно (Фіг 5A). Крім того, вивчення кінетики показує, що продукція р24 в супернатанті, яка не включає клітин, дуже сильно знижується у разі 1 мкг/мл очищені імунсорбційним методом антитіла від ВІЛ-1-інфікованих пацієнтів, незалежно від часу після інфікування, у порівнянні з контролями (Фіг. 5Б).

Далі, хотіли визначити ефект інгібування NKp44L, що здійснювали даними нейтралізуючими bNAb, які специфічно розпізнають W614A 3S/gp41 мутований мотив, очищений з ВІЛ-1 - інфікованих пацієнтів. На Фіг. 5B показано, що всі NAb проти W614A зберігали свою здатність інгібувати NKp44L, порівняно з 3S-сенсibilізованими контрольними клітинами; однак, порівняно з антитілом до 3S-gp41 дикого типу із мишей або очищений із ВІЛ-1 пацієнта (#117), ефективність трохи зменшена. Дійсно, $21,9\%$ клітин експресували NKp44L в присутності очищеного Ab проти 3S-WT, тоді як від $21,9$ до $34,6\%$ клітин залишаються NKp44L⁺ після обробки bNAb проти W614A мутованого 3S/gp41 від ВІЛ-1-інфікованих пацієнтів. Важливо, що спільно культивовані аутологічні $CD4^+T$ клітини, оброблені диким типом або очищеним антитілом до W614A 3S/gp41, з аутологічними IL2-активованими NK клітинами показали, що експресія CD107a значно знижена або припинена, зі значеннями, що змінюються між $1,8$ та $7,8\%$ $CD107a^+NKp44^+NK$ клітин, порівняно з $28,6\%$ у разі NK клітин, спільно культивованих з 3S-сенсibilізованими клітинами мішенями $CD4^+T$ у відсутності Ab (Фіг. 5Г). В цілому вищевказані дані показують, що еліситація природних bNAb проти специфічної мутованої форми мотиву 3S/gp41 спостерігається у деяких інфікованих ВІЛ-1, володіючи дихотомічними ефектами, які об'єднують як нейтралізацію вірусу, так і інгібування виснаження популяції $CD4$.

Таблиця 1

Аналіз нейтралізації в клітинах Hela P4C5

Вірус	3S/gp41 мутант	Корецептор специфічність	IC_{50} (мкг/мл)	IC_{95} (мкг/мл)
NL4.3		X4	>20	>20
	S613A		>20	>20
	W614A		3,4	17,4
	S615A		7,1	>20
	N616A		5,8	19,5
	K617A		>20	>20
	S618A		8,0	>20
BRU		X4	>20	>20
	S613A		>20	>20
	W614A		3,8	6,7
	S615A		8,1	>20
	N616A		3,3	6,0
	K617A		>20	>20
	S618A		8,6	>20
NDK		X4	>20	>20
	S613A		>20	>20
	W614A		3,3	12,9
	S615A		5,9	>20
	N616A		4,2	>20
	K617A		>20	>20
	S618A		8,9	>20
JR-CSF		R5	18,1	>20
	S613A		>20	>20
	W614A		6,1	19,5

Продовження таблиці 1

	S615A		15,7	>20
	N616A		5,6	>20
	K617A		>20	>20
	S618A		11,0	>20
YU-2		R5	>20	>20
	S613A		>20	>20
	W614A		10,3	19,5
	S615A		17,7	>20
	N616A		8,3	>20
	K617A		>20	>20
	S618A		16,8	>20

Таблиця 2

Аналіз нейтралізації в клітинах TZM-bl

Вірус	3S/gp41 мутант	Корецептор специфічність	IC ₅₀ (мкг/мл)	IC ₉₅ (мкг/мл)
NL4.3		X4	>20	>20
	S613A		>20	>20
	W614A		5,4	17,4
BRU		X4	>20	>20
	S613A		>20	>20
	W614A		3,9	11,9
NDK		X4	>20	>20
	S613A		>20	>20
	W614A		6,3	18,9
JR-CSF		R5	>20	>20
	S613A		>20	>20
	W614A		8,1	19,5
YU-2		R5	>20	>20
	S613A		>20	>20
	W614A		10,3	20
ROD		ВИЧ-2		
	S613A		>20	>20
	W614A		>20	>20

Таблиця 3

Характеристики та нейтралізуюча активність ВІЛ-інфікованих пацієнтів, які утворюють антитіла до W614A-3S/gp41, специфічні до W614 3S/gp41 мутанту

	ВІЛ-інфіковані пацієнти					
	#105 ^a	#24	#44	#65	#71	#109
CD4 число/мм ³	752	825	816	650	856	1040
Відношення CD4/CD8	0,7	1,0	1,1	0,8	0,7	1,2
Вірусне навантаження	<20	<20	<20	<20	<20	<20
Антитіло до W614 (АУ/мл)	<10	220	220	140	150	250
Активність Nab у плазмі ^b						
(IC ₅₀ /IC ₉₅)						
NL4.3	<40/<40	1280/75	1115/56	827/<40	452/<40	>2000/875
YU-2	<40/<40	480/<40	360/<40	220/<40	128/<40	1120/65
Активність Nab з очищеним антитілом ^b						
(IC ₅₀ /IC ₉₅)						

Продовження таблиці 3

NL4.3	>2/>2	0,3/1,5	0,3/1,6	1,5/>2	1,8/>2	<0,2/0,6
NDK	>2/>2	0,4/1,9	0,6/>2	1,8/>2	1,9/>2	<0,2/0,9
JRCSF	>2/>2	0,8/>2	0,9/>2	>2/>2	>2/>2	0,2/1,6
YU-2	>2/>2	1,4/>2	1,3/>2	1,8/>2	1,9/>2	0,3/1,9
ROD	>2/>2	>2/>2	>2/>2	>2/>2	>2/>2	>2/>2
Активність Nab з очищеним антитілом ^Г						
(IC ₅₀ /IC ₉₅)						
NL4.3	>2/>2	0,4/1,6	0,4/1,9	1,6/>2	1,9/>2	<0,2/1,1
BRU	>2/>2	0,5/>2	0,9/>2	1,9/>2	>2/>2	0,3/2,6
JRCSF	>2/>2	0,9/>2	1,4/>2	>2/>2	>2/>2	0,9/1,9
YU-2	>2/>2	1,7/>2	1,6/>2	>2/>2	>2/>2	0,6/1,7
ROD	>2/>2	>2/>2	>2/>2	>2/>2	>2/>2	>2/>2

^а #107: зразок ВІЛ-інфікованого, який не утворює антитіла до W614-3S/gr, але 125 AU/мл антитіла до 3S WT. Специфічні антитіла очищали імуносорбційним методом із сироваток з пептидом 3S-WT в якості контролю

^б Активність NAb в сироватці виражена як кратність розбавлення інактивованої нагріванням плазми, яка встановила 50 % (IC₅₀) або 95 % (IC₉₀) інгібування, відповідно, вірусної інфекції в клітинах Hela P4C5.

^в Активність NAb у очищеного антитіла виражена в мікрограмах антитіла, яка встановлює 50 % (IC₅₀) або 95 % (IC₉₀) інгібування, відповідно, вірусної інфекції в клітинах Hela P4C5.

^Г Активність NAb у очищеного антитіла виражена в мікрограмах антитіла, яка встановлює 50 % (IC₅₀) або 95 % (IC₉₀) інгібування, відповідно, вірусної інфекції в клітинах TZM-bl.

Таблиця 4

	поліпептиди						
	WT	S613A	W614A	S615A	N616A	K617A	S618A
Ад.	<1:20	<1:20	<1:20	<1:20	<1:20	<1:20	<1:20
WT	>1:1280	1:1280	<1:20	1:320	1:160	1:640	1:320
M1	1:1280	>1:1280	1:20	1:640	1:320	1:640	1:640
M2	1:40	1:40	>1:1280	1:20	1:80	<1:20	1:20
M3	1:320	1:320	<1:20	>1:1280	1:320	1:160	1:320
M4	1:640	1:640	<1:20	1:640	>1:1280	1:80	1:160
M5	1:1280	1:1280	<1:20	1/80	1/40	>1:1280	1:80
M6	1:640	1:640	1:20	1:160	1:160	1:40	>1:1280

S45WO_ST25_CORRECTED.txt
ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

- <110> 1) ІННАВІРВАКС
2) ІНСТІТУТ НАСЬОНАЛЬ ДЕ ЛА САНТ ЕТ ДЕ ЛА РЕШЕРШ МЕДІКАЛЬ
- <120> КОМПОЗИЦІЇ ДЛЯ ПОПЕРЕДЖЕННЯ
І/АБО ЛІКУВАННЯ ІНФЕКЦІЇ, ВИКЛИКАНОЇ ВІРУСОМ ВІЛ-1
- <130> PR95302
- <140> PCT/IB2012/051842
<141> 2012-04-13
- <150> EP 11305451.4
<151> 2011-04-15
- <160> 20
- <170> Версія, що патентується 3.5
- <210> 1
<211> 6
<212> ПРТ
<213> штучні послідовності
- <220>
<223> пептид
- <220>
<221> змішана властивість
<222> (1)..(6)
<223> Три з чотирьох амінокислотних залишків, що розташовані у позиціях 2, 3,
4 і 6
позначають конкретну амінокислоту, яку визначено у їх відповідному
значенні (i) і
четвертий амінокислотний залишок, який залишився, визначено у своєму
значенні (ii)
- <220>
<221> змішана властивість
<222> (2)..(2)
<223> (i) позначає W або (ii) позначає будь-який з A, R, D, N, C, Q, E, G, H,
I, L,
K, F, M, P, S, T, Y, або V
- <220>
<221> змішана властивість
<222> (3)..(3)
<223> (i) позначає S або (ii) позначає будь-який з A, R, N, D, C, Q, E, G, H,
I, L,
F, M, P, K, T, Y, W або V
- <220>
<221> змішана властивість
<222> (4)..(4)
<223> (i) позначає N або (ii) позначає будь-який з A, R, S, D, C, Q, E, G, H,
I, K,
L, F, M, P, T, Y, W або V
- <220>
<221> змішана властивість
<222> (6)..(6)
<223> (i) позначає S або (ii) позначає будь-який з A, R, N, D, C, Q, E, G, H,
I, K,
L, F, M, P, T, Y, W або V

S45WO_ST25_CORRECTED.txt

<400> 1

Ser Xaa Xaa Xaa Lys Xaa
1 5

<210> 2

<211> 6

<212> ПРТ

<213> штучні послідовності

<220>

<223> пептид

<220>

<221> змішана властивість

<222> (2)..(2)

<223> X позначає будь-який з A, R, D,N, C, Q, E, G, H, I, L, K, F, M, P, S, T, Y, або V

<400> 2

Ser Xaa Ser Asn Lys Ser
1 5

<210> 3

<211> 6

<212> ПРТ

<213> штучні послідовності

<220>

<223> пептид

<220>

<221> змішана властивість

<222> (3)..(3)

<223> X позначає будь-який з A, R, D,N, C, Q, E, G, H, I, L, K, F, M, P,T, Y, W або V

<400> 3

Ser Trp Xaa Asn Lys Ser
1 5

<210> 4

<211> 6

<212> ПРТ

<213> штучні послідовності

<220>

<223> пептид

<220>

<221> змішана властивість

<222> (4)..(4)

<223> X позначає будь-який з A, R, D, C, Q, E, G, H, I, L, K, F, M, P, S, T, Y, W або V

<400> 4

S45WO_ST25_CORRECTED.txt

Ser Trp Ser Xaa Lys Ser
1 5

<210> 5
<211> 6
<212> ПРТ
<213> штучні послідовності

<220>
<223> пептид

<220>
<221> змішана властивість
<222> (6)..(6)
<223> X позначає будь-який з A, R, D,N, C, Q, E, G, H, I, L, K, F, M, P, T, Y,
W або V

<400> 5

Ser Trp Ser Asn Lys Xaa
1 5

<210> 6
<211> 6
<212> ПРТ
<213> штучні послідовності

<220>
<223> пептид

<400> 6

Ser Ala Ser Asn Lys Ser
1 5

<210> 7
<211> 6
<212> ПРТ
<213> штучні послідовності

<220>
<223> пептид

<400> 7

Ser Trp Ala Asn Lys Ser
1 5

<210> 8
<211> 6
<212> ПРТ
<213> штучні послідовності

<220>
<223> пептид

<400> 8

Ser Trp Ser Ala Lys Ser
1 5

S45W0_ST25_CORRECTED.txt

<210> 9
 <211> 6
 <212> ПРТ
 <213> штучні послідовності

<220>
 <223> пептид

<400> 9

Ser Trp Ser Asn Lys Ala
 1 5

<210> 10
 <211> 4
 <212> ПРТ
 <213> штучні послідовності

<220>
 <223> пептид

<400> 10

Pro Trp Asn Ala
 1

<210> 11
 <211> 5
 <212> ПРТ
 <213> штучні послідовності

<220>
 <223> пептид

<400> 11

Leu Asp Asp Ile Trp
 1 5

<210> 12
 <211> 15
 <212> ПРТ
 <213> штучні послідовності

<220>
 <223> пептид

<400> 12

Pro Trp Asn Ala Ser Ala Ser Asn Lys Ser Leu Asp Asp Ile Trp
 1 5 10 15

<210> 13
 <211> 15
 <212> ПРТ
 <213> штучні послідовності

<220>
 <223> пептид

<400> 13

Pro Trp Asn Ala Ser Trp Ala Asn Lys Ser Leu Asp Asp Ile Trp
 1 5 10 15

S45WO_ST25_CORRECTED.txt

<210> 14
 <211> 15
 <212> ПРТ
 <213> штучні послідовності

<220>
 <223> пептид

<400> 14

Pro Trp Asn Ala Ser Trp Ser Ala Lys Ser Leu Asp Asp Ile Trp
 1 5 10 15

<210> 15
 <211> 15
 <212> ПРТ
 <213> штучні послідовності

<220>
 <223> пептид

<400> 15

Pro Trp Asn Ala Ser Trp Ser Asn Lys Ala Leu Asp Asp Ile Trp
 1 5 10 15

<210> 16
 <211> 30
 <212> ПРТ
 <213> людина розумна

<220>
 <221> СПЕЦИФ_ЗАЛИШОК
 <222> (1)..(1)
 <223> АЦЕТИЛЮВАННЯ

<220>
 <221> СПЕЦИФ_ЗАЛИШОК
 <222> (14)..(14)
 <223> АЦЕТИЛЮВАННЯ

<400> 16

Asn His Asn His Arg Ile Arg Thr Asn Pro Ala Ile Val Lys Thr Glu
 1 5 10 15

Asn Ser Trp Ser Asn Lys Ala Lys Ser Ile Cys Gln Gln Gln
 20 25 30

<210> 17
 <211> 6
 <212> ПРТ
 <213> штучні послідовності

<220>
 <223> полі-гістидин тег

<400> 17

His His His His His His
 1 5

S45WO_ST25_CORRECTED.txt

<210> 18
 <211> 16
 <212> ПРТ
 <213> штучні послідовності

<220>
 <223> ВІЛ-1 НХВ2 штам-похідні gp41 пептиду
 <400> 18

Cys Pro Trp Asn Ala Ser Trp Ser Asn Lys Ser Leu Asp Asp Ile Trp
 1 5 10 15

<210> 19
 <211> 16
 <212> ПРТ
 <213> штучні послідовності

<220>
 <223> S613A мутований пептид
 <400> 19

Cys Pro Trp Asn Ala Ala Trp Ser Asn Lys Ser Leu Asp Asp Ile Trp
 1 5 10 15

<210> 20
 <211> 16
 <212> ПРТ
 <213> штучні послідовності

<220>
 <223> K617A мутований пептид
 <400> 20

Cys Pro Trp Asn Ala Ser Trp Ser Asn Ala Ser Leu Asp Asp Ile Trp
 1 5 10 15

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

5

1. Імуногенна композиція, що містить антигенний пептид, вибраний з групи, що складається з:

- PWNASASNKSLDDIW (SEQ ID NO: 12),
- PWNASWANKSLDDIW (SEQ ID NO: 13),
- PWNASWSAKSLDDIW (SEQ ID NO: 14) і
- PWNASWSNKALDDIW (SEQ ID NO: 15).

10

2. Імуногенна композиція за п. 1, яка **відрізняється** тим, що антигенний пептид ковалентно зв'язаний з молекулою-носієм.

3. Імуногенна композиція за п. 1 або 2, яка **відрізняється** тим, що антигенний пептид об'єднаний щонайменше з одним імуноад'ювантом.

15

4. Імуногенна композиція за будь-яким з пп. 1-3, яка **відрізняється** тим, що складається з вакцинної композиції, де антигенний пептид об'єднано щонайменше з одним імуноад'ювантом.

5. Антигенний пептид, вибраний з групи, що складається з:

- PWNASASNKSLDDIW (SEQ ID NO: 12),
- PWNASWANKSLDDIW (SEQ ID NO: 13),
- PWNASWSAKSLDDIW (SEQ ID NO: 14) і
- PWNASWSNKALDDIW (SEQ ID NO: 15).

20

6. Антигенний пептид за п. 5, який **відрізняється** тим, що даний антигенний пептид ковалентно зв'язаний з молекулою-носієм.

7. Спосіб детектування і/або кількісного визначення антитіл до антигенного пептиду у зразку, що включає в себе наступні стадії:

5 а) приведення зразка, що підлягає тестуванню, у контакт з одним чи більш ніж одним антигенним пептидом за п. 5, і

б) детектування і/або кількісне визначення комплексів, які утворено між даними антигенними пептидами і антитілами, що присутні у даному зразку.

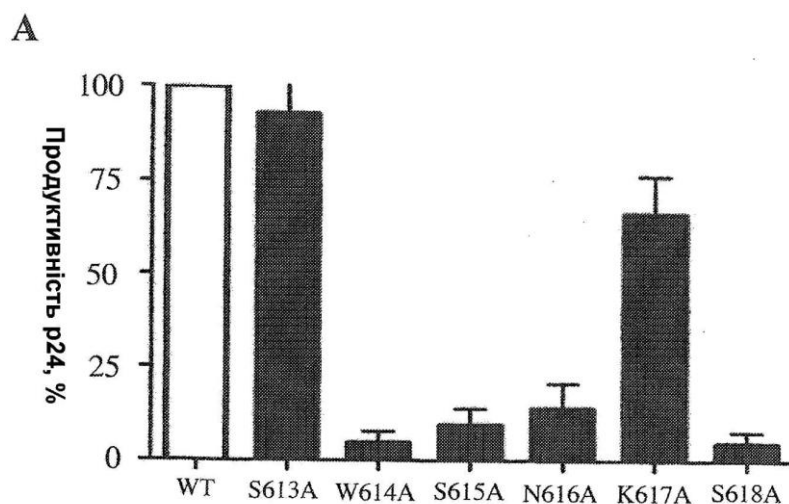
8. Набір для детектування і/або кількісного визначення антитіл до антигенного пептиду у зразку, що містить:

а) один або більше ніж один антигенний пептид за п. 5, і

б) один або більше ніж один реагент для детектування комплексів, що утворені між даними антигенними пептидами і антитілами, які присутні у даному зразку.

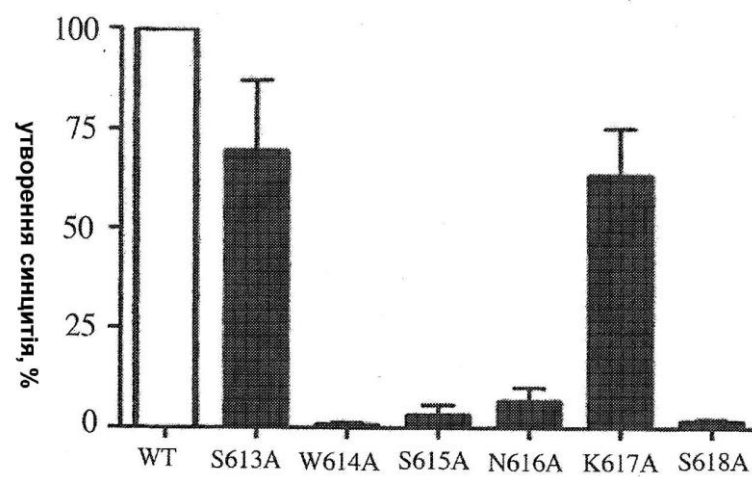
Дикий тип: NH₂-C-P-W-N-A-S-W-S-N-K-S-L-D-D-I-W-COOH
 S613A (M1) : NH₂-C-P-W-N-A-A-W-S-N-K-S-L-D-D-I-W-COOH
 W614A (M2) : NH₂-C-P-W-N-A-S-A-S-N-K-S-L-D-D-I-W-COOH
 S615A (M3) : NH₂-C-P-W-N-A-S-W-A-N-K-S-L-D-D-I-W-COOH
 N616A (M4) : NH₂-C-P-W-N-A-S-W-S-A-K-S-L-D-D-I-W-COOH
 K617A (M5) : NH₂-C-P-W-N-A-S-W-S-N-A-S-L-D-D-I-W-COOH
 S618A (M6) : NH₂-C-P-W-N-A-S-W-S-N-K-A-L-D-D-I-W-COOH

ФІГ. 1



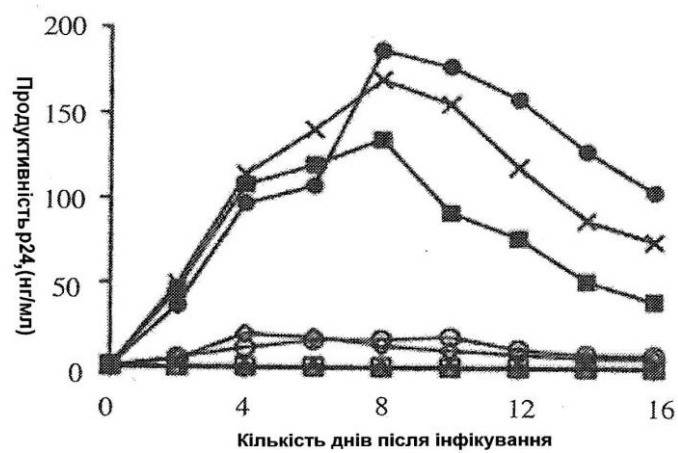
Фіг. 2A

В



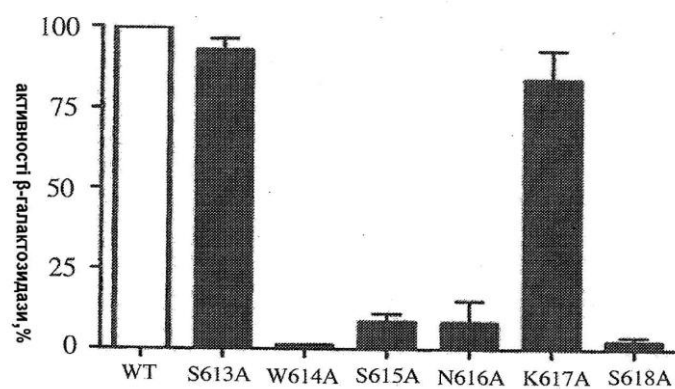
Фиг. 2Б

С

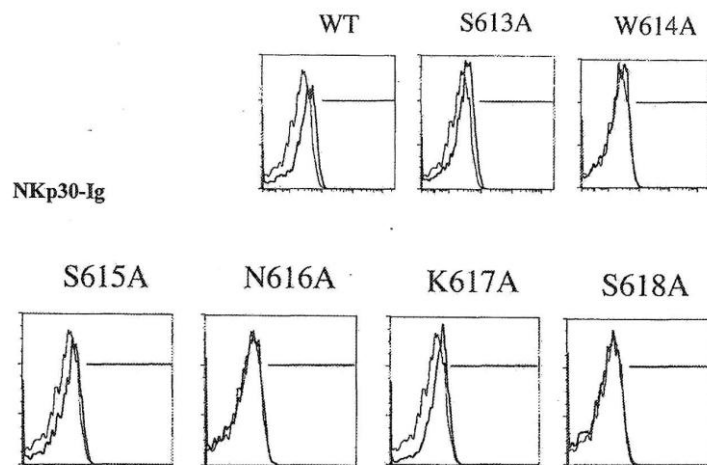


Фиг. 2В

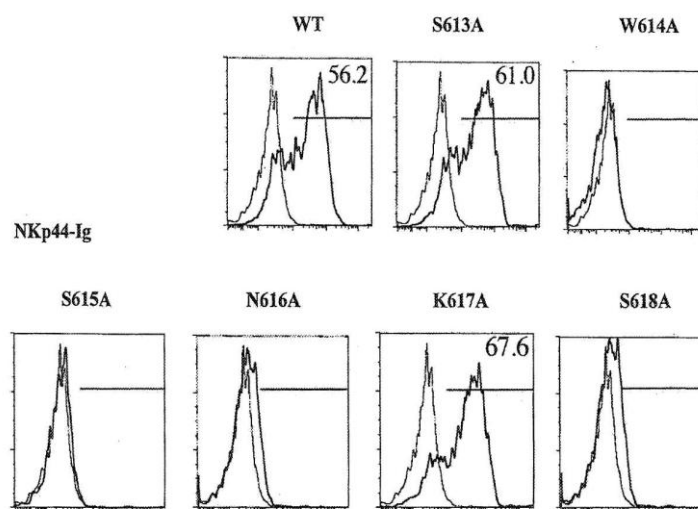
Д



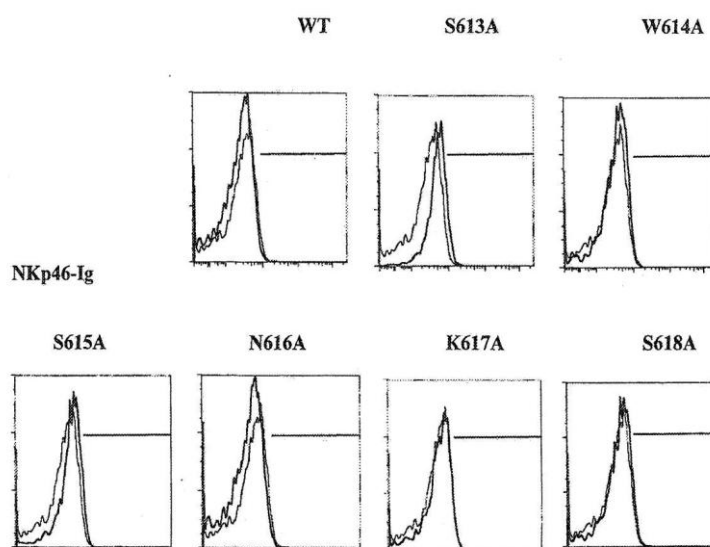
Фиг. 2Г



Фиг. 3А



Фиг. 3А (продовження)



Фиг. 3А (продовження)

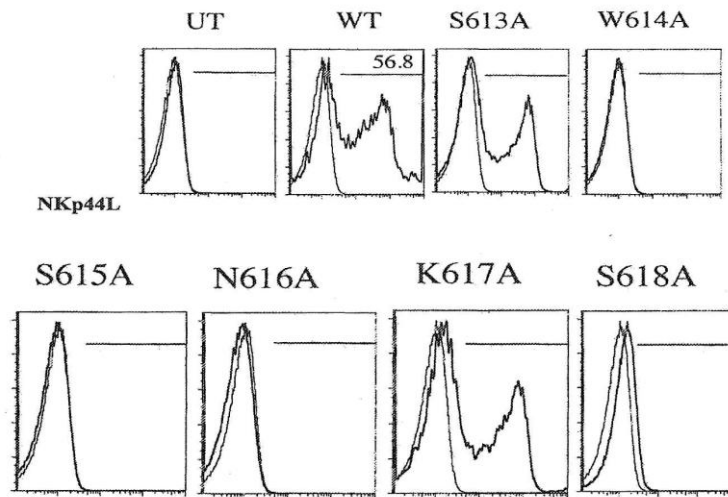
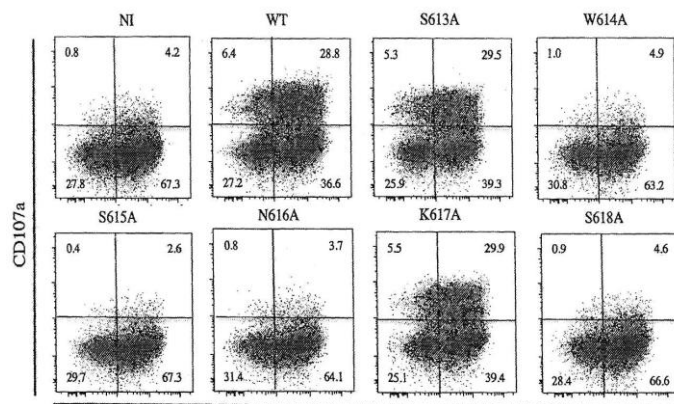
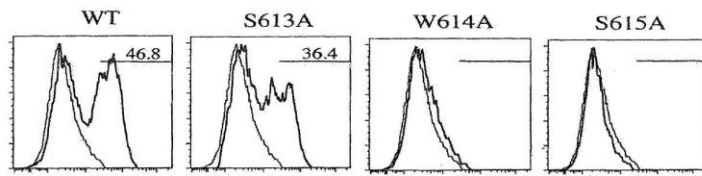


Fig. 3E

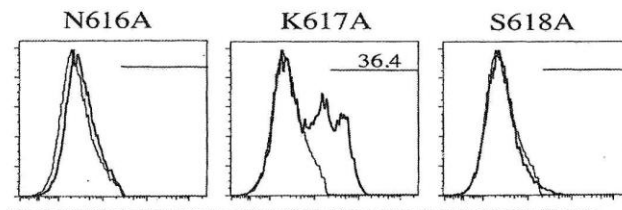


NKp44

Fig. 3B

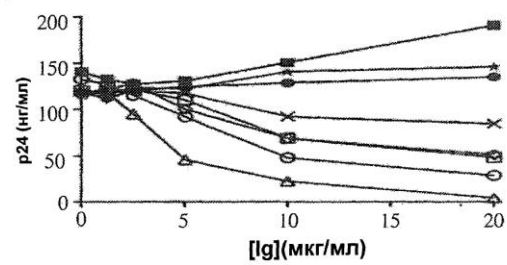
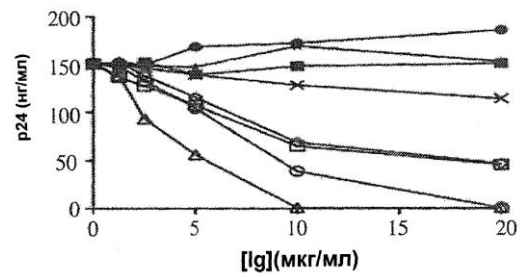


CD107A

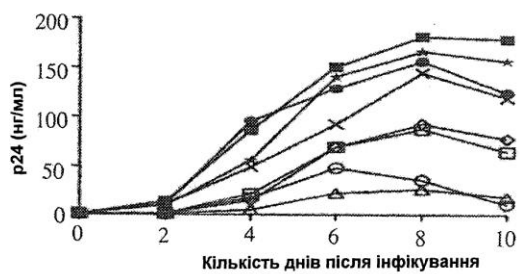
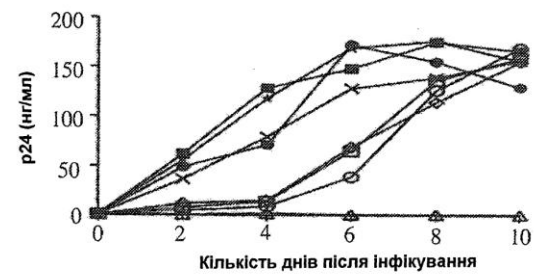


CD107A

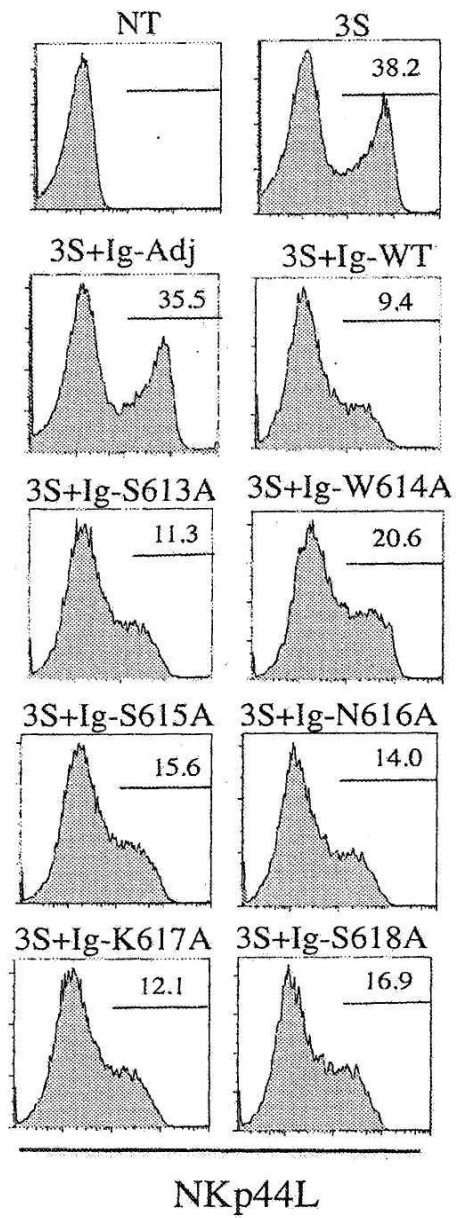
Fig. 3F



ФІГ. 4А



ФІГ. 4Б



ΦΙΓ. 4B

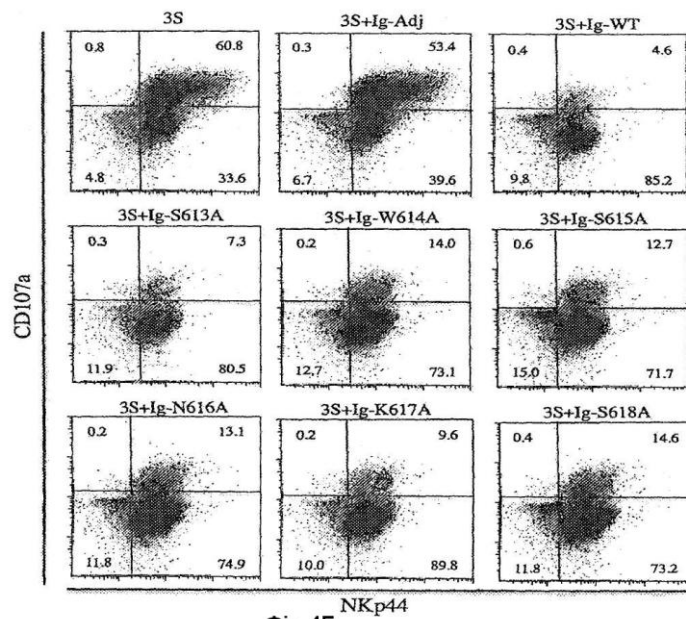
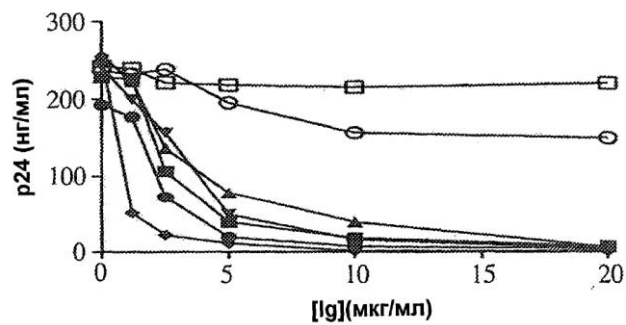
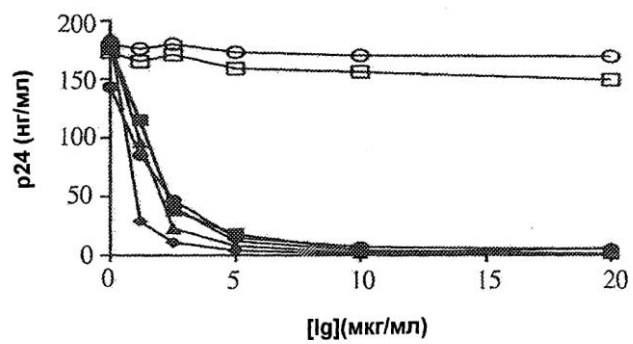
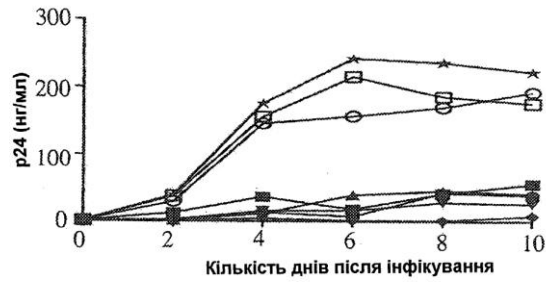
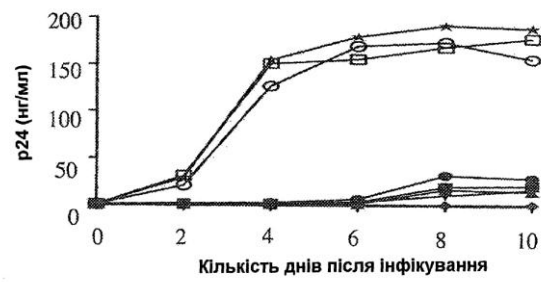


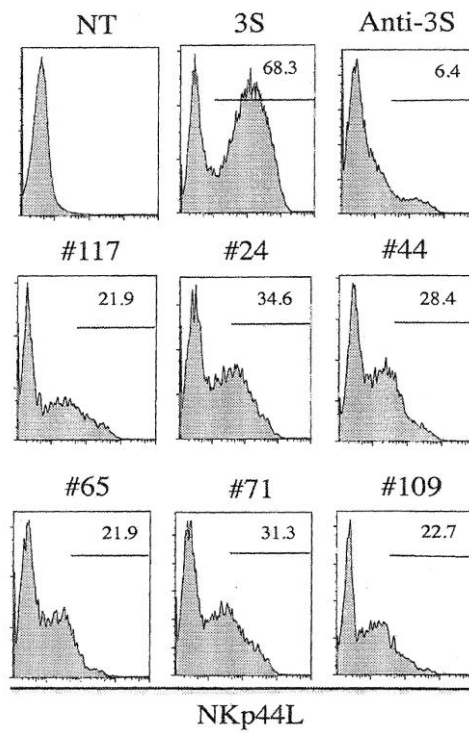
Fig. 4Г



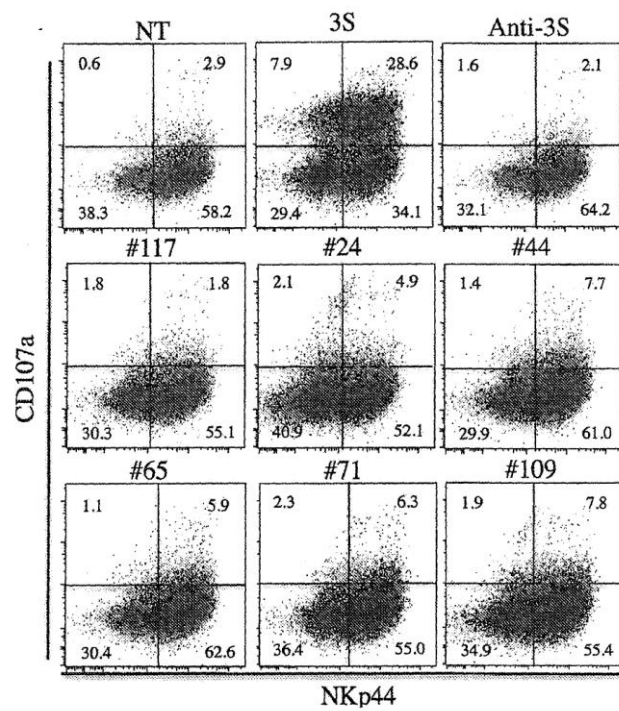
Фиг. 5А



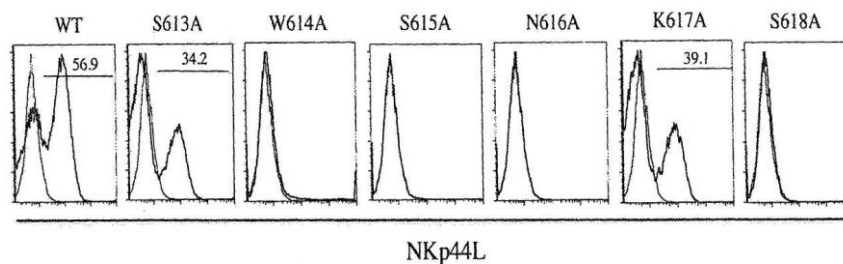
ФІГ. 5Б



ФІГ. 5В

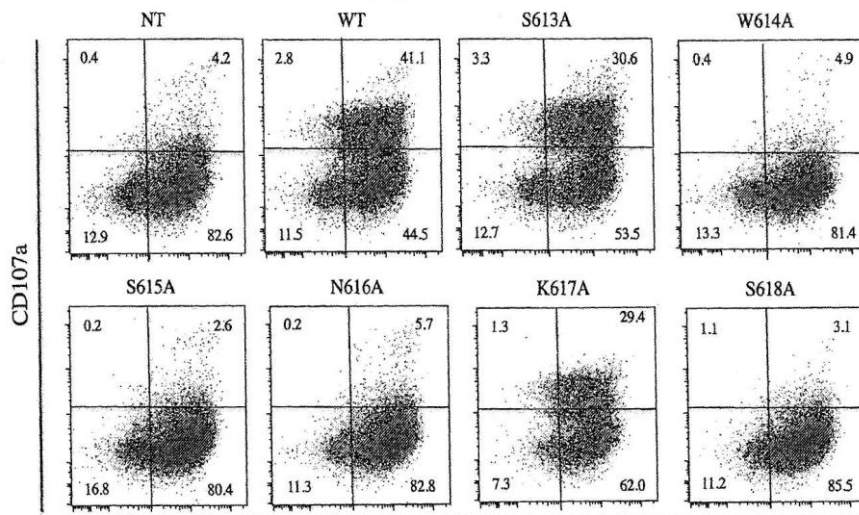


Фиг. 5Г



NKp44L

Фиг. 6А



NKp44

Фиг. 6Б

Комп'ютерна верстка М. Мацело

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Василя Липківського, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601