



(51) МПК

C07K 14/16 (2006.01)*C07K 16/08* (2006.01)*A61K 38/10* (2006.01)*A61K 39/12* (2006.01)*A61P 31/18* (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) **СКОРРЕКТИРОВАННОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ**

Примечание: библиография отражает состояние при переиздании

(21), (22) Заявка: **2004106618/13, 05.08.2002**(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
05.08.2002(30) Конвенционный приоритет:
07.08.2001 IT TO2001A000795
02.11.2001 IT TO2001A001042(43) Дата публикации заявки: **10.07.2005**(45) Опубликовано: **10.11.2008**Опубликовано на CD-ROM:
MIMOSA RBI 2008/31D RBI200831D(15) Информация о коррекции:
Версия коррекции № 1 (W1 C2)(48) Коррекция опубликована:
10.02.2009 Бюл. № 4/2009(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: **US 5185147, 09.02.1993. PAPSIDERO et**
al., "Human immunodeficiency virus type 1-
neutralizing monoclonal antibodies wich react
with p17 core protein: characterization and
epitope mapping", Journal of Virology, 1989,
v.63, no.1, с.267-272. RU 2111010 C1, 20.05.1998.(85) Дата перевода заявки РСТ на национальную фазу:
09.03.2004(86) Заявка РСТ:
IB 02/03093 (05.08.2002)(87) Публикация РСТ:
WO 03/016337 (27.02.2003)Адрес для переписки:
129010, Москва, ул. Б.Спасская, 25, стр.3,
ООО "Юридическая фирма Городисский и
Партнеры", пат.пов. Е.Е.Назиной, рег. № 517

(72) Автор(ы):

КАРУЗО Арнальдо (IT),
ФРАНЦОНЕ Жозе Себастьян (IT)

(73) Патентообладатель(и):

МЕДЕСТИ ИНТЕРНАЦИОНАЛЕ С.Р.Л. (IT)

RU 2 337 922 C9

RU 2 337 922 C9

(54) **ИЗОЛИРОВАННЫЕ ПОЛИПЕПТИДЫ НА ОСНОВЕ НЕЙТРАЛИЗУЮЩЕГО ЭПИТОПА БЕЛКА p17 ВИРУСА ВИЧ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В КАЧЕСТВЕ ВАКЦИН, А ТАКЖЕ НЕЙТРАЛИЗУЮЩИЕ АНТИ-p17-АНТИТЕЛА, СПЕЦИФИЧЕСКИ РАСПОЗНАЮЩИЕ УКАЗАННЫЙ НЕЙТРАЛИЗУЮЩИЙ ЭПИТОП**(57) Реферат: биотехнологии. Описывается полипептид белка p17
Изобретение относится к иммунологии и вируса ВИЧ с аминокислотной

последовательностью, состоящей из пептида, соответствующего нейтрализующему эпитопу белка р17 ВИЧ, и пептида, соответствующего положениям 23-30 белка р17 ВИЧ. Пептид связан с пептидом нейтрализующего эпитопа в карбоксиконцевом положении эпитопа и придает ему растворимость. Раскрыты вакцинные композиции на основе полипептида, варианты применения полипептида, такие как для приготовления лекарственного средства против ВИЧ, а также в качестве специфического реагента в тесте на обнаружение нейтрализующих анти-р17-антител. Описаны моноклональные и поликлональные анти-р17-антитела, способные

специфическим образом распознавать нейтрализующий эпитоп полипептида и нейтрализовать его биологическую активность. Раскрыто использование указанных антител к полипептиду для обнаружения р17 в биологическом материале и для приготовления лекарственного средства, ингибирующего активность белка р17 у инфицированных ВИЧ. Использование изобретения позволяет индуцировать нейтрализующие анти-р17-антитела и ингибировать активность р17, что может найти применение в медицине для приготовления вакцины или прививочного материала против ВИЧ. 9 н. и 8 з.п. ф-лы.

RU 2 3 3 7 9 2 2 C 9

RU 2 3 3 7 9 2 2 C 9



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

(51) Int. Cl.

C07K 14/16 (2006.01)*C07K 16/08* (2006.01)*A61K 38/10* (2006.01)*A61K 39/12* (2006.01)*A61P 31/18* (2006.01)(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

Note: Bibliography reflects the latest situation

(21), (22) Application: **2004106618/13, 05.08.2002**(24) Effective date for property rights: **05.08.2002**(30) Priority:
07.08.2001 IT TO2001A000795
02.11.2001 IT TO2001A001042(43) Application published: **10.07.2005**(45) Date of publication: **10.11.2008**Published on CD-ROM:
MIMOSA RBI 2008/31D **RBI200831D**(15) Correction information:
Corrected version no 1 (W1 C2)(48) Corrigendum issued on:
10.02.2009 Bull. 4/2009(85) Commencement of national phase: **09.03.2004**(86) PCT application:
IB 02/03093 (05.08.2002)(87) PCT publication:
WO 03/016337 (27.02.2003)Mail address:
129010, Moskva, ul. B.Spasskaja, 25, str.3,
OOO "Juridicheskaja firma Gorodisskij i
Partnery", pat.pov. E.E.Nazinoj, reg. № 517(72) Inventor(s):
KARUZO Arnal'do (IT),
FRANTsONE Zhoze Sebast'jan (IT)(73) Proprietor(s):
MEDESTI INTERNATsIONALE S.R.L. (IT)(54) **ISOLATED POLYPEPTIDES BASED ON NEUTRALISING OF PROTEIN p17 OF HIV VIRUS, USED AS VACCINES, AND NEUTRALISING ANTI-p17-ANTIBODIES, SPECIFICALLY RECOGNISING SAID NEUTRALISING**

(57) Abstract:

FIELD: chemistry, pharmaceuticals.

SUBSTANCE: invention relates to immunology and biotechnology. Described is polypeptide of protein P17 of HIV virus with amino acid sequence, consisting of peptide, corresponding to neutralising epitope of protein p17 of HIV, and peptide, corresponding to positions 23-32 of protein p17 of HIV. Peptide is bound to peptide of neutralising in carboxy-terminal position of epitope and makes it soluble. Described are vaccine compositions based on polypeptide, versions of polypeptide application such as, for

preparation of medication against HIV, and as specific reagent in test on detecting neutralising anti-p-17-antibodies. Described are monoclonal and polyclonal anti-p 17-antibodies, able to recognise neutralising polypeptide epitope in specific way and neutralise its biological activity. Described is application of said antibodies to polypeptide for detecting p17 in biological material and for preparation of medication inhibiting p17 protein activity in HIV-infected people. Application of invention allows to induce neutralising anti- p17-antibodies and inhibit p17 activity which can be applied in

medicine for preparation of vaccine of injection material against HIV.

EFFECT: obtaining composition which can be

applied in medicine for preparation of vaccine or injection material against HIV.

17 cl, 9 ex

R U 2 3 3 7 9 2 2 C 9

R U 2 3 3 7 9 2 2 C 9

Настоящее изобретение относится к изолированным полипептидам на основе последовательности аминоконцевой области белка р17 ВИЧ, используемым для терапии и диагностики синдрома приобретенного иммунодефицита человека (AIDS, СПИД), а также к нейтрализующим анти-р17-антителам, которые специфически распознают такую

5 аминоконцевую последовательность.

СПИД включает в себя группу клинических синдромов, вызванных ретровирусом, называемым вирусом иммунодефицита человека (HIV, ВИЧ). ВИЧ инфицирует преимущественным образом клетки, экспрессирующие на своей поверхности антиген CD4, и, следовательно, Т-лимфоциты-хелперы и макрофаги, а также дендритные клетки

10 лимфатических узлов.

Заражение ВИЧ может блокироваться *in vitro* с помощью антител, полученных из сыворотки инфицированных пациентов.

За последние годы были разработаны различные антитела, нейтрализующие ВИЧ, большинство которых взаимодействует с белковыми продуктами гена *env*.

15 Такие белковые продукты находят применение в качестве иммуногенов в различных формах, например, в виде гликопротеиновых экстрактов, рекомбинантных белков и синтетических пептидов.

Продукты гена *env* традиционно рассматриваются как наиболее иммуногенные белки ВИЧ и наиболее пригодны для стимуляции защитной иммунной реакции против ВИЧ.

20 Однако внимание исследователей привлекают также белки, закодированные другими генами ВИЧ, например, *gag*. Как известно, ген *gag* кодирует полипротеин-предшественник с молекулярной массой около 550000 (р55), который разрезается протеазой *pol* на полипептиды р24, р17 и р15, составляющие структурные белки ядра вириона.

В некоторых исследованиях было показано, что продукты гена *gag* могут служить

25 мишенью нейтрализующей иммунной реакции.

Было обнаружено, что белок р17 ВИЧ может служить мишенью для антител, нейтрализующих репликацию ВИЧ и что высокие уровни содержания анти-р17-антител коррелируют с замедлением развития СПИД.

В патенте США 5185147 раскрыты некоторые изолированные полипептидные

30 последовательности на основе аминоконцевой области р17, способные индуцировать анти-р17-антитела, которые взаимодействуют с вирусной частицей ВИЧ, изменяя инфицирующую способность *in vitro*. Однако в соответствии с данными электронной микроскопии (например, Andreassen H., H.Bohr, J.Bohr, S.Brunak, T.Bugge, R.M.J.Cotterill, C.Jacobsen, P.Kush, B.Lautrup, S.B.Petersen, T.Saemark и K.Ulrich,

35 1990, J.Acquir. Immune Def. Syndr. 3:615-622) белок р17 находится в вирусной частице и поэтому недоступен для взаимодействия с анти-р17-антителами. В связи с этим изменение инфицирующей способности вирусной частицы ВИЧ *in vitro*, которое наблюдалось в цитированной работе, не может быть приписано эффективному ингибированию биологической активности белка р17.

40 Проблема, к которой относится настоящее изобретение, состоит в обнаружении полипептидов на основе последовательности белка р17, которые бы обладали способностью эффективно индуцировать антитела, нейтрализующие биологическую активность белка р17 ВИЧ.

Для решения указанной проблемы авторы настоящего изобретения, прежде всего,

45 исследовали механизм биологического действия белка р17.

Как более подробно изложено в разделе, касающемся примеров, авторы установили, что, с одной стороны, биологическая активность р17 определяется его способностью повышать продукцию таких провоспалительных цитокинов, обладающих про-ВИЧ-эффектом, таких как IFN- γ и TNF- α , а с другой стороны, его способностью повышать

50 продукцию указанных провоспалительных цитокинов, в случае ингибирования таким анти-воспалительным цитокином, как, например, IL-4.

Кроме этого авторы изобретения обнаружили, что биологическая активность белка р17 проявляется в результате взаимодействия между белком в виде самостоятельного

объекта, отделенного от вирусной частицы, и специфическими рецепторами, экспрессированными на поверхности клетки-мишени ВИЧ. Существование таких рецепторов белка р17 на лимфоцитах, являющихся мишенью для ВИЧ, до настоящего времени не предполагалось.

5 Основой настоящего изобретения является обнаружение взаимодействия р17/рецептор.

В результате исследования взаимодействия в системе р17/рецептор авторы изобретения фактически идентифицировали область белка р17, представляющую собой участок, связывающийся с рецептором клетки и способный выявлять антитела, ингибирующие биологическую активность белка р17, и исследовали их связывание с самим

10 рецептором. В настоящем описании такие антитела обозначены как «нейтрализующие анти-р17-антитела», а в соответствующих случаях такая область связывания обозначается как «нейтрализующий эпитоп».

Таким образом, авторы изобретения подтвердили тот факт, что изолированные полипептиды, имеющие аминокислотную последовательность на основе

15 последовательности нейтрализующего эпитопа р17, т.е. последовательность на N-концевом участке, расположенном между аминокислотными положениями 9 и 22 белка р17, способны решить проблему, адресованную настоящим изобретением, поскольку благодаря своей вторичной структуре такие полипептиды способны индуцировать антитела, нейтрализующие биологическую активность белка р17. В этой связи, рассматриваемые

20 полипептиды особенно подходят для использования в вакцине, препятствующей репликации ВИЧ.

Аминокислотные остатки последовательности р17, используемой в изобретении, нумеруют способом, предложенным в работе Ratner et al. (1985), Nature 313:277.

Кроме этого было показано, что полипептиды настоящего изобретения специфически

25 распознаются нейтрализующими моноклональными анти-р17-антителами, тогда как они не распознаются моноклональными анти-р17-антителами, не обладающими нейтрализующей способностью. В связи с этим, рассматриваемые полипептиды особенно подходят для использования в диагностических методах обнаружения наличия нейтрализующих анти-р17-антител у объектов, инфицированных ВИЧ, а также в способах очистки таких антител.

В связи со сказанным выше, первая цель настоящего изобретения относится к

30 изолированному полипептиду, способному специфически реагировать с нейтрализующим анти-р17-антителом-ВИЧ, аминокислотная последовательность которого соответствует последовательности нейтрализующего эпитопа белка р17 ВИЧ, другими словами представляет собой последовательность, расположенную между 9 и 22 позициями в

35 последовательности белка р17 ВИЧ.

Как более подробно описывается в следующих примерах, авторы изобретения вначале сконструировали указанный выше синтетический полипептид на основе

40 последовательности нейтрализующего эпитопа белка р17, содержащегося в плазмиде ВН10 (лабораторный образец). Такой синтетический полипептид имеет последовательность NH₂-Ser-Gly-Gly-Glu-Leu-Asp-Arg-Trp-Glu-Lys-Ile-Arg-Leu-Arg-COOH (SEQ ID NO: 2). Авторы изобретения экспериментально подтвердили, что такой полипептид специфически распознается нейтрализующими моноклональными антителами, полученными против белка р17 плазмиды ВН10.

Таким образом, этот полипептид можно использовать в качестве иммуногена,

45 вызывающего продукцию антител, нейтрализующих биологическую активность р17 ВН10.

В дальнейшем было подтверждено, что варианты белка р17, характерные для других штаммов ВИЧ, имеют изменения в области нейтрализующего эпитопа, которые, однако, незначительно влияют на их распознавание антителами, нейтрализующими биологическую

50 активность р17. В качестве примера, иллюстрирующего цитированные варианты, можно привести последовательность р17 вирусных штаммов, распространенных в Африке (clade C).

Изолированные полипептиды с аминокислотными последовательностями на основе последовательности, расположенной между положениями 9 и 22 в белке р17 вирусных

штаммов, распространенных в специальных географических районах, позволяют получать антитела, обладающие большим сродством по сравнению с соответствующим белком p17, что обуславливает возможность их применения в качестве вакцин в указанных географических районах.

5 На основании информации о последовательностях, содержащейся в банках генетических данных (например, GenBank) и относящейся к последовательности p17 штаммов из различных географических районов, авторы согласно изобретению получили серии синтетических полипептидов, соответствующих положениям 9-22 p17 различных штаммов ВИЧ, которые обладают иммунологическим свойством, заключающимся в
10 специфической реакции с нейтрализующими антителами, направленными против p17 соответствующего штамма ВИЧ.

Рассматриваемые полипептиды отвечают следующей общей формуле:

$\text{NH}_2\text{-X}^1\text{-Gly-X}^2\text{-X}^3\text{-Leu-Asp-X}^4\text{-Trp-Glu-X}^5\text{-Ile-X}^6\text{-Leu-Arg-COOH}$ (SEQ ID NO: 1), в которой X^1

15 представляет собой аминокислотный остаток, выбранный из Ser и Arg; X^2 представляет собой аминокислотный остаток, выбранный из Gly, Glu и Ser; X^3 представляет собой аминокислотный остаток, выбранный из Glu, Lys, Asp и Arg; X^4 представляет собой аминокислотный остаток, выбранный из Arg, Ala, Lys, Thr, Ser, Glu, Asp и Gln; X^5 представляет собой аминокислотный остаток, выбранный из Lys, Arg, и Ser; а X^6
20 представляет собой аминокислотный остаток, выбранный из Arg и Gln.

Все аминокислоты, идентифицированные в настоящем описании, находятся в L-конфигурации. Сокращения, используемые для названий аминокислотных остатков, соответствуют стандартной номенклатуре.

Среди описанной выше группы полипептидов полипептид с аминокислотной последовательностью $\text{NH}_2\text{-Ser-Gly-Gly-Glu-Leu-Asp-Arg-Trp-Glu-Lys-Ile-Arg-Leu-Arg-COOH}$ (SEQ ID NO: 2) относится к предпочтительному воплощению изобретения.

Рассматриваемый полипептид соответствует последовательности между положениями 9 и 22 p17 лабораторного штамма ВН10 вируса ВИЧ-1, являющегося представителем штаммов, существующих в Европе и Америке (clade B).

30 Для повышения растворимости полипептиды согласно изобретению могут связываться с подходящей второй аминокислотной последовательностью, например, с последовательностью $\text{-Pro-Gly-Gly-Lys-Lys-Lys-Tyr-Lys-COOH}$ (SEQ ID NO: 3), соответствующей положениям 23-30 последовательности белка p17 штамма ВН10 ВИЧ-1.

В соответствии с таким воплощением настоящего изобретения вторую аминокислотную последовательность соединяют непосредственно с карбокситерминальным остатком полипептида.
35

Полипептиды согласно изобретению обладают способностью индуцировать нейтрализующую иммунную реакцию при применении на пациенте, инфицированном соответствующим штаммом ВИЧ, и в связи с этим подходят для использования в вакцине.

40 В контексте настоящего описания термин вакцина охватывает композицию, содержащую полипептид согласно изобретению в качестве активного ингредиента и фармацевтически приемлемый носитель, причем применение эффективного количества такой композиции способно стимулировать иммунитет субъекта, например млекопитающего, включая человека.

45 В связи со сказанным выше, вторая цель настоящего изобретения относится к составу вакцины, включающему в себя полипептид согласно изобретению и фармацевтически приемлемый носитель. Такая композиция также подходит для использования в качестве инокулята, предназначенного для применения на млекопитающих, отличных от человека, с целью генерации антител, вступающих в иммунную реакцию с ВИЧ, в особенности
50 нейтрализующих анти-p17-антител ВИЧ.

В соответствии с предпочтительным воплощением, когда полипептиды используют в составе вакцины или инокулята, полипептиды можно конъюгировать с подходящей молекулой-носителем, другими словами, с молекулой, способной сшиваться с полипептидом и придавать ему иммуногенные свойства. Упомянутый выше полипептид,

конъюгированный с носителем, охватывается областью согласно изобретению.

Примерами носителей, подходящих для таких целей, могут служить такие белки, как KLN (гемоцианин лимфы улитки), эдестин, тироглобулин, такие альбумины, как бычий сывороточный альбумин (BSA) или альбумин человеческой сыворотки (HSA), такие эритроциты, как эритроциты барана (SRBC), столбнячный анатоксин, холерный анатоксин, такие полиаминокислоты, как, например, поли(D-лизин:D-глутаминовая кислота), и т.п.

С целью облегчения связывания полипептида с молекулой-носителем к N-концу или C-концу полипептида могут быть присоединены аминокислотные остатки. Для этой цели в качестве дополнительного остатка на C-конце полипептида лучше всего использовать цистеин (Cys), поскольку, как известно, цистеин способен образовывать дисульфидные связи.

Следовательно, в том случае, когда полипептид согласно изобретению подлежит конъюгации с носителем, предпочтительно, чтобы он содержал дополнительный остаток цистеина (Cys), связанный с карбоксиконцевым остатком полипептида. В этом контексте выражение «карбоксиконцевой остаток полипептида» относится к карбоксиконцевому остатку последовательности нейтрализующего эпитопа белка p17 (Arg 22 в SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2) или к карбоксиконцевому остатку второй аминокислотной последовательности, функция которой состоит в увеличении растворимости полипептида (Lys 30 в SEQ ID NO: 3).

В соответствии с другим воплощением изобретения рассматриваемый полипептид может содержать дополнительный остаток норлейцина (Nleu) в C-концевом положении, которое предшествует положению упомянутого выше дополнительного цистеинового остатка, с целью лучшего отслеживания пептида в ходе процесса конъюгации с молекулой-носителем.

Таким образом, в соответствии с одним из воплощений изобретения полипептид конъюгирует с носителем, предпочтительно с помощью дополнительного остатка цистеина (Cys) или дополнительного дипептида Nleu-Cys в C-концевом положении.

В качестве альтернативы применению носителя полипептиды согласно изобретению могут использоваться в виде разветвленных пептидов.

В этой связи упомянутый выше полипептид в виде разветвленных пептидов также входит в область настоящего изобретения.

Выражение «разветвленный пептид» относится к комплексу с большой молекулярной массой, состоящему из множества идентичных копий полипептида согласно изобретению, связанных с центральным ядром, которое способно одновременно связывать множество идентичных копий указанного полипептида.

Разветвленный пептид может быть получен путем связывания нескольких копий полипептида с центральным ядром полилизина «MAP technology», в результате чего достигается большая молекулярная масса и обеспечивается иммуногенность даже в отсутствие молекулы-носителя (Nordelly B., et al., 1992, J. Immunol. 148:914-920).

Кроме того, ядро полилизина может подвергаться модификации, например, в соответствии с Okeda K., et al., 1993, Journal of Molecular Recognition 6: 101-109 или замещаться такими другими веществами, как, например, глюкоза, которая обладает одинаковой с полилизином способностью к связыванию нескольких молекул полипептида с образованием высокомолекулярных комплексов.

Выбор носителя или типа ядра основан на известных критериях и практически не зависит от природы используемого эпитопа, вследствие чего он не является специальным объектом настоящего изобретения и его подробное описание не приводится.

Состав вакцины или инокулята согласно изобретению, кроме того, может содержать дополнительные ингредиенты, включающие в себя, например, антигенный адъювант, представляющий собой вещество, способное повышать эффективность или иммуногенность антигена.

Поскольку некоторые адъюванты, подходящие для животных, не применимы для людей, для вакцины и инокулята могут использоваться одинаковые или различные адъюванты.

Примерами адъювантов, используемых в вакцине, могут служить Alum (гидроксид алюминия), неполный адъювант Фрейнда и соединение MF59, недавно описанное Graham B.S., et al. (Ann. Int. Med. 1996, 125: 270-279).

5 Вакцина или инокулят согласно изобретению содержит эффективное количество полипептида согласно изобретению. Эффективное количество полипептида в стандартной дозе зависит от ряда критериев, которые, как хорошо известно, среди прочего, включают в себя природу объекта инокуляции, массу тела объекта, подлежащего инокуляции, и предписанного режима применения. Вакцины и прививочные материалы обычно содержат полипептид в количестве, которое может изменяться в интервале 1-100 микрограммов/кг в
10 случае использования на млекопитающих среднего размера (козы, собаки и обезьяны) и на людях, и в интервале от 10 мг до 500 микрограммов в расчете на дозу в случае применения на мелких животных (мыши, крысы, кролики, хомячки).

Рассматриваемые количества основаны на массе полипептида как такового, без учета массы носителя, если он присутствует.

15 Как отмечалось выше, полипептиды согласно изобретению могут использоваться в качестве специальных реагентов для анализов на определение наличия в образце биологического материала, нейтрализующих анти-p17-антител, т.е. антител, направленных против белка p17 и способных нейтрализовать биологическую активность указанного белка.

Такой анализ может использоваться, например, для мониторинга противовирусных и
20 иммуномодулирующих терапий, а также для мониторинга развития заражения ВИЧ.

Такой анализ также может использоваться в промышленных применениях, например, для контроля количества иммуноглобулиновых препаратов против p17, получаемых хроматографическими методами и другими препаративными технологиями.

Анализ на обнаружение нейтрализующих антител против p17 может представлять собой
25 иммунологический анализ, такой, например, как иммуноферментный анализ в гетерогенной фазе (ELISA, твердофазный иммуноферментный анализ) или в гомогенной фазе (EMIT, иммуноанализ с ферментативным усилением), радиоиммунологический анализ, иммунологический анализ на основе флуоресценции, вестерн-блоттинг или любая другая методика, в которой антитело или антиген маркируют детектируемой молекулой или
30 любыми другими индикаторными средствами.

Изолированный полипептид на основе нейтрализующего эпитопа p17 согласно изобретению или смесь таких полипептидов могут использоваться в качестве антигена. Полипептид может необязательно конъюгироваться с молекулой-носителем с целью облегчения связывания с носителем или для увеличения молекулярной массы с целью
35 лучшего распознавания в анализе вестерн-блоттинг.

Так, например, в иммуноферментном тесте ELISA полипептид согласно изобретению, используемый в качестве антигена, может наноситься на твердую подложку, например, на титрационный микропланшет, полоску или лунку с использованием способов, известных в данной области техники.

40 После нанесения антигена на твердый носитель его инкубируют в присутствии образца интересующего биологического материала, т.е. материала, в котором желают подтвердить наличие нейтрализующих анти-p17-антител.

Такой биологический материал может представлять собой, например, плазму, сыворотку, спинномозговую жидкость, мочу, слюну или клеточный сок или тканевую
45 культуральную жидкость и т.п.

Связанное антитело может обнаруживаться в результате добавления антисыворотки или моноклонального антитела, конъюгированного с ферментом. Для этой цели может использоваться любая известная ферментная метка (например, пероксидаза хрена, щелочная фосфатаза и т.п.). Чувствительность теста может быть улучшена в результате
50 использования биотин-авидиновой или стрептавидиновой системы для детекции аналита.

Окончательное обнаружение может проводиться путем добавления раствора субстрата, который может изменяться в зависимости от природы используемого фермента. Примерами подходящих субстратов могут служить О-фенилендиамин,

тетраметилбензидин, паранитрофенилфосфат. Полученные результаты могут регистрироваться визуально или с применением спектрофотометра.

Может проводиться как качественный, так и количественный тест на нейтрализующие анти-p17-антитела. Количественный тест может проводиться известными методами,

5 например титрованием в конечной точке или построением эталонной кривой.

Полипептиды согласно изобретению также могут использоваться в качестве специальных реагентов для очистки нейтрализующих анти-p17-антител из биологической пробы. Такая биологическая проба может представлять собой образец биологического материала, взятый у субъекта, например образец крови, плазмы, сыворотки, слюны, мочи

10 или образец асцитной жидкости, ткани или клеточной культуральной жидкости, либо препарата иммуноглобулина.

Указанный субъект может представлять собой пациента человеческого рода, инфицированного вирусом ВИЧ, или млекопитающее, отличное от человека, которому сделана прививка белка, способного вызывать продуцирование нейтрализующих анти-p17-

15 антител. Таким белком может служить, например, белок p17 вируса ВИЧ в практически очищенной или рекомбинантной форме, или полученный из него полипептид, содержащий по меньшей мере нейтрализующий эпитоп p17, идентифицированный в настоящем изобретении, причем такой полипептид необязательно конъюгирован с носителем или находится в виде разветвленного пептида, или в любой другой иммуногенной форме.

В данном контексте выражение «белок p17 в практически очищенной форме» относится к белку p17, практически изолированному от остатка вирусной частицы.

Нейтрализующие антитела могут быть очищены с помощью любого известного метода аффинной очистки с использованием полипептида согласно изобретению или смеси таких полипептидов в качестве очищающего реагента.

25 Для этого полипептид, используемый в качестве очищающего реагента, связывают с матриксом, подходящим для использования в аффинных методах очистки, например с агарозой, силикагелем, полиакриламидом, магнитными гранулами и т.п.

Связывание полипептида с матриксом может обеспечиваться путем сшивания функциональных групп, присутствующих в матриксе и в пептиде в результате введения

30 спейсерной группы. Обычно спейсерные группы представляют собой C₆-C₈-алифатические цепочки с функциональными группами, способными образовывать мостик между матриксом и пептидом. Для этой цели могут использоваться как гидрофобные функциональные группы (например, спейсерные группы, включая бензольное кольцо), так и гидрофильные функциональные группы (например, спирты). Альтернативой спейсерным группам могут

35 служить молекулы-носители или биотин.

Во избежание денатурации пептида и для облегчения его связывания с матриксом полезно проводить предварительную активацию матрикса, в результате которой последующее связывание лиганда может осуществляться в мягких условиях.

Активация представляет собой химическую реакцию между матриксом и активирующими

40 веществами, приводящую к образованию на поверхности самого матрикса реакционноспособных групп, которые быстро соединяются с лигандными группами.

Известны такие реакционноспособные группы, как имидокарбонат, оксиран, трихлортриазин, О-имидазолкарбонил и т.п. Спейсер с концевой аминогруппой может активироваться по реакции с N-гидроксисукцинимидным сложным эфиром или с

45 бромуксусной кислотой с образованием высокорекционноспособного алкилирующего агента.

С другой стороны, полипептид может связываться с матриксом посредством ковалентных связей, например, с использованием триазиновой смолы.

Наконец, полипептид может связываться с матриксом в результате образования

50 двухсторонних ковалентных связей.

Аффинная связь между полипептидом, присоединенным к матриксу, и анти-p17-антителами может разрушаться либо непосредственно, в результате создания условий, которые препятствуют биоспецифическим взаимодействиям, либо в результате

конкурентного аффинного элюирования.

Анти-p17-антитела, специфически связывающиеся с полипептидом согласно изобретению, способны нейтрализовать биологическую активность белка p17 вируса ВИЧ и препятствовать взаимодействию между белком и его клеточным рецептором (см. пример 7).

Такие антитела могут быть получены по описанной выше методике очистки или в виде моноклональных антител с помощью метода слияния клеток, описанного в примере 6.

Авторы изобретения также установили, что моноклональные анти-p17-антитела, не обладающие способностью нейтрализовать биологическую активность белка p17 вируса ВИЧ, также неспособны связывать нейтрализующий эпитоп белка p17 в анализе ELISA, проводимом в твердой фазе (см. пример 8).

В связи с этим, другая цель настоящего изобретения относится к моноклональному или поликлональному антителу против белка p17 вируса ВИЧ, которое способно нейтрализовать биологическую активность белка p17 ВИЧ и специфически распознавать нейтрализующий эпитоп белка p17 ВИЧ, причем нейтрализующий эпитоп представляет собой аминокислотную последовательность, расположенную между 9 и 22 позициями последовательности белка p17 ВИЧ.

В соответствии с предпочтительным воплощением аминокислотная последовательность нейтрализующего эпитопа, распознаваемого антителом, согласно изобретению

представляет собой последовательность: X¹-Gly-X²-X³-Leu-Asp-X⁴-Trp-Glu-X⁵-Ile-X⁶-Leu-Arg- (SEQ ID NO: 1), где X¹ представляет собой аминокислотный остаток, выбранный из Ser и Arg; X² представляет собой аминокислотный остаток, выбранный из Gly, Glu и Ser; X³ представляет собой аминокислотный остаток, выбранный из Glu, Lys, Asp и Arg; X⁴ представляет собой аминокислотный остаток, выбранный из Arg, Ala, Lys, Thr, Ser, Glu, Asp и Gln; X⁵ представляет собой аминокислотный остаток, выбранный из Lys, Arg и Ser; X⁶ представляет собой аминокислотный остаток, выбранный из Arg и Gln. Более предпочтительная аминокислотная последовательность имеет вид: -Ser-Gly-Gly-Glu-Leu-Asp-Arg-Trp-Glu-Lys-Ile-Arg-Leu-Arg (SEQ ID NO: 2).

Антитела согласно изобретению могут использоваться в клинических, терапевтических или профилактических целях, в качестве специфических антагонистов белка p17 для селективной иммуносупрессии физиологического ответа, индуцированного таким вирусным белком, и, в частности, тех реакций, которые вовлечены в активацию провоспалительного иммунного процесса и которые зависят от взаимодействия p17 с его клеточным рецептором.

В этой связи другой целью настоящего изобретения является применение описанного выше антитела для приготовления медикамента, предназначенного для ингибирования иммуностимулирующих эффектов белка p17 ВИЧ, проявляющихся в ходе ВИЧ-инфицирования.

С этой целью антитела согласно изобретению могут использоваться в нативной форме, в денатурированной форме или в виде антигенсвязывающих иммуноглобулиновых фрагментов (т.е. фрагментов F(Ab')₂, Fab, Fab' или Fv). Такие фрагменты иммуноглобулина могут быть получены химическими, ферментативными методами или с помощью технологии рекомбинантной ДНК, например, с использованием миниантител.

Фрагменты антител или антитела применяют, предпочтительно, парентеральным методом, более предпочтительно, внутривенно; кроме этого весьма предпочтительно проводить медленное применение, например, с помощью стандартного набора для внутривенного введения или из подкожного депо.

При парентеральном применении антитела формируют в виде стандартной дозы в форме для инъекций, например, в виде раствора, эмульсии или суспензии, в состав которых также входит фармацевтически приемлемый носитель. Указанный носитель может быть водным или неводным и, кроме этого, может содержать вещества, способные повышать изотоничность и химическую устойчивость лекарственного средства. Такое антитело предпочтительно готовить в очищенной форме, практически не содержащей

агрегатов и других белков, при различных концентрациях, предпочтительно в интервале 0,5-20 мг/мл.

Дозу, подлежащую применению, определяют путем измерения влияния анти-p17-антитела на уменьшение параметров, являющихся признаками заболевания, подлежащего
5 лечению. С учетом естественного клиренса антител дозу можно периодически повторять в соответствии с клиническим статусом пациента и степенью репликации ВИЧ. В профилактических целях можно использовать короткие двухмесячные, шестимесячные или годовые курсы применения анти-p17-антител.

Кроме этого антитела согласно изобретению могут использоваться в качестве
10 специальных реагентов в анализе на обнаружение белка p17, например, в такой пробе биологического материала, как образец тканевой культуры или клеточной культуральной жидкости, или образец биологического материала, взятого у пациента.

Анализ на обнаружение антигена может осуществляться таким традиционным методом, как конкурентный иммунологический анализ или анализ с захватом антигена (RIA, ELISA,
15 вестерн-блоттинг, TR-FIA и т.п.). Для проведения конкурентного иммунологического анализа может использоваться натуральный или рекомбинантный белок p17 либо один или более полипептидов на основе нейтрализующего эпитопа белка p17 согласно изобретению. Эти вещества могут быть конъюгированы с такими маркерами, как, например, ферменты для метода ELISA, радиоактивные материалы для методов RIA или флуоресцентные
20 молекулы для методов TR-FIA или других иммунофлуоресцентных методов. Обнаружение антигена может осуществляться методами иммунофлуоресценции, проточной цитометрии или другими известными способами.

Представленные ниже примеры носят исключительно иллюстративный характер и никоим образом не ограничивают область согласно изобретению.

25 ПРИМЕРЫ

Пример 1

Продукция рекомбинантного p17

Кодирующую последовательность белка p17 BH-10 изолята ВИЧ-1 (аминокислоты 1-32, Ratner L., W.Haseltine, R.Patacra, K.J.Livak, B.Starcich, S.F.Josephs, E.R.Doran,
30 J.A.Rafalski, E.A.Whitehoren, K.Baumeister, L.Ivanoff, S.R.Petteway, M.L.Pearson, J.A.Lautenberger, T.S.Papas, J.Ghrayeb, N.T.Chang, R.C.Gallo и F.Wong-Staal, 1985, Nature 313: 277-284) амплифицировали с помощью PCR и клонировали в сайте BamH1 плазмиды pGEX-2T (Pharmacia, Uppsala, Sweden), что обеспечивало ее слияние с NH₂-концом фермента глутатион-S-трансферазы (GST).

Используемые праймеры и олигонуклеотидные последовательности выбирались на основе данных для HIVBH10 из банка данных GenBank, которые соответствовали полному геному изолята BH-10 вируса ВИЧ-1. Правильность последовательности клонированного гена p17 подтверждали с использованием секвенирующих праймеров pGEX (Pharmacia), автоматического ДНК-секвенатора (ABI PRISM 310; Perkin Elmer, Foster City, CA) и
40 оборудования ABI PRISM с набором Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit с AmpliTaq-ДНК-полимеразой FS (Perkin Elmer).

Слитые белки GST экспрессировали в *Escherichia coli* и очищали с использованием гранулированного глутатиона-4 В-сефарозы (Pharmacia). Вирусные белки разрезали с помощью GST в связанном состоянии с агарозо-глутатионовыми гранулами в соответствии
45 с методикой, описанной Gearing D.P., N.A.Nicola, D.Metcalf, S.Foote, T.A.Willson, N.M.Gough и R.L.Williams, 1989, BioTechnology 7: 1157-1161.

Белок p17 дополнительно очищали методом обращенно-фазовой FPLC, достигая чистоты более 98%.

Отсутствие загрязнения эндотоксинами в препарате рекомбинантного p17 вируса ВИЧ-1
50 (<0,1 единиц эндотоксина/мл) подтверждали с помощью теста на основе *Limulus amoebocytes* (Whitaker BioProducts, Inc, Walkersville, Maryland, USA). Очищенный p17 вируса ВИЧ-1 также подвергали биотинилированию с использованием AN-NHS-биотина (SPA, Milan, Italy) в соответствии с инструкциями производителя.

Пример 2

Культивация периферических мононуклеарных кровяных клеток крови (PBMC)

PBMC выделяли в градиенте плотности Ficoll-Hypaque (Pharmacia) из

гепаринизированной крови, взятой у здоровых субъектов. Клетки высевали в 96-луночные

5 культуральные планшеты с U-образным дном (Nunc, Roskild, Denmark) с плотностью 10^6 клеток/мл, и культивировали в течение указанного числа дней при 37°C в среде RPMI-1640 (Sigma, St.Louis, Mo) дополненной 10% человеческой АВ сывороткой, инактивированной нагреванием (Sigma), пенициллином в количестве 100 ед./мл и стрептомициновой полной средой 100 мкг/мл.

10 Пример 3

Влияние p17 на секрецию TNF- α и INF- γ под действием PBMC, стимулированных IL-2

Для решения вопроса о влиянии p17 на продукцию некоторых провоспалительных цитокинов, т.е. TNF- α и INF- γ , которые, как хорошо известно, способны создавать

15 окружающую среду, более подходящую для репликации вируса ВИЧ-1, проводили серию экспериментов по измерению секреции таких цитокинов клетками PBMC в культуральной среде, стимулированной IL-2 в отсутствие и в присутствии p17. Тестировались различные дозы IL-2 в интервале 2,5-100 ед./мл.

Во всех проанализированных объектах доза 20 ед./мл обеспечивала последовательную индукцию секреции как в случае TNF- α , так и в случае INF- γ в супернатанте культуры

20 PBMC. Добавление различных доз p17 увеличивало продукцию рассматриваемых цитокинов клетками PBMC, обработанными IL-2. Максимальное увеличение отмечалось при концентрации p17 порядка 50 нг/мл, хотя p17 обладает биологической активностью и при более низких концентрациях вплоть до 5 нг/мл. При концентрации p17 50 нг/мл такое увеличение более выражено для TNF- α (от 36 до 100% и более), чем для INF- γ (от 29 до 50%).

25 При использовании культур нестимулированных PBMC не наблюдалось повышения продукции цитокинов под действием белка p17.

Пример 4

30 Реверсия ингибирования, индуцированного IL-4, на продукцию TNF- α и INF- γ белком p17

Добавление IL-4 в культуры PBMC, стимулированные IL-2, приводило к снижению продукции как INF- γ , так и TNF- α . Понижение секреции INF- γ составило 62-83%, в то время как уменьшение секреции TNF- α составляло 68-84%.

Для решения вопроса о способности p17 противодействовать ингибирующему действию IL-4 вирусный белок добавляли к PBMC в начале культивации одновременно с IL-2 и IL-4.

35 Через 72 часа культивирования супернатанты собирали и анализировали на секрецию TNF- α и INF- γ .

Во всех проведенных экспериментах были получены результаты, показывающие, что p17 способен восстанавливать способность PBMC к продукции TNF- α и INF- γ на 88-100% и

40 77-89% соответственно.

Пример 5

Тест на связывание p17 со специфическим клеточным рецептором

Для того чтобы решить вопрос о взаимосвязи активности p17 и взаимодействия с рецептором, экспрессированным на клетке-мишени, вирусный белок конъюгировали с

45 биотином и вводили в реакцию с клетками PBMC, выделенными у здоровых субъектов, или подвергнутыми 48 часовой стимуляции в присутствии фитогемоагглютинаина (PHA).

Затем p17 идентифицировали на поверхности клетки методом проточной цитометрии с использованием стрептавидина, маркированного фикоэритрином.

Использовали следующую методику проведения эксперимента. Клетки PBMC

50 подвергали стимуляции в течение двух дней в присутствии ФГА в концентрации 5 мкг/мл или оставляли без стимуляции, после чего проводили инкубацию в течение 30 минут на льду в присутствии различных количеств биотинилированного p17 в интервале от 50 до 1,6 мкг/мл. PBMC дважды промывали PBS и инкубировали в течение 30 минут на льду в

присутствии подходящего количества стрептавидина, конъюгированного с фикоэритрином (Becton Dickinson, San Jose, California), разбавленным в PBS, содержащем 2% фетальной телячьей сыворотки (FCS). В некоторых экспериментах клетки окрашивали анти-CD-4-, анти-CD-8-, анти-CD-16- или анти-CD-19-моноклональными антителами,

5 конъюгированными с изоцианатом флуоресцеина (FITC) (Becton Dickinson). Для оценки фоновой флуоресценции также использовали конъюгаты антитела, предназначенные для контроля изотипа IgG (Becton Dickinson). Затем клетки дважды промывали PBS, содержащим 2% FCS и 0,2% NaN₃, и анализировали на проточном цитометре FACSCalibur (Becton Dickinson). Анализ осуществляли с помощью программного обеспечения CellQuest
10 (Becton Dickinson).

Результаты, полученные на свежих РВМС, взятых у пациента, показали, что р17 не связывает Т-лимфоциты CD-4+и CD-8+, а также НК-клетки (CD-16+), но в то же время было установлено, что такой белок присутствует на поверхности большинства В-лимфоцитов (CD-19+). С другой стороны, при стимуляции Т-лимфоциты CD-4+и CD-8+, а также НК-
15 лимфоциты приобретают способность к связыванию р17.

Полученные данные показывают, что на циркулирующих лимфоцитах имеется рецептор для р17 вируса ВИЧ и что он конститутивно экспрессируется на В-лимфоцитах, в то время как он индуцибельно экспрессируется на поверхности Т-лимфоцитов.

Пример 6

20 Продукция нейтрализующих моноклональных анти-р17-антител

Самкам мышей разновидности Balb/c прививали 100 мкг р17 из Примера 1, эмульгированного в полном адъюванте Фрейнда, и с 15-дневными промежутками делали инъекции 100 мкг белка в неполном адъюванте. Через три дня из бустера №4 удаляли селезенки с целью слияния клеток. Методика слияния, предусматривающая использование
25 клеток мышинной миеломы NS-O в присутствии 50% полиэтиленгликоля, описана Horan Hand, P., A.Thor, D.Wunderlich, R.Muraro, A.Caruso and J.Schlom, 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 5227-5231.

Специфичность антител определяли методами ELISA и вестерн-блоттинга. 96-луночные титрационные микропланшеты из полистирола покрывали р17 (0,25 мкг/лунку) в
30 карбонатном буфере. После промывки PBS, содержащего 0,05% Tween-20 (об./об.), в лунки, покрытые р17, добавляли супернатант тканевой культуры гибридомы. После одночасовой инкубации при 37°C и промывки связывание р17-моноклональных антител детектировали с использованием анти-мышинных козьих антител IgG, конъюгированных с пероксидазой хрена (Deco, Glostra, Denmark), с последующим добавлением о-фенилендиамина в качестве субстрата для колориметрической реакции.
35

Реакционную способность моноклональных антител с нативным р17 оценивали с помощью вестерн-блоттинга с использованием коммерческого набора для вестерн-блоттинга ВИЧ-1 (Sanofi Diagnostic Pasteur, Marnes La Coquette, France).

Пример 7

40 Тест на нейтрализацию биологической активности р17 вируса ВИЧ-1

Проверяли способность моноклональных анти-р17-антител, полученных в Примере 6, оказывать влияние на биологическую активность р17 и взаимодействие белка с его клеточным рецептором, экспрессированным на Т- и В-лимфоцитах.

Клетки РВМС подвергали тройному культивированию в 96-луночных планшетах с U-образными днищами в полной среде с IL-2 (в концентрации 20 ед./мл) в присутствии или
45 в отсутствие различных концентраций очищенного рекомбинантного р17 (концентрации в интервале 2,5-100 нг/мл). Ингибирование секреции TNF- α и INF- γ достигалось добавлением IL-4 (20 нг/мл) к клеткам, стимулированным IL-2. В начале культивирования к клеткам добавляли анти-р17-антитела в концентрации 0,5-10 мкг/мл. Через три дня активации
50 клеток культуральные супернатанты собирали и тестировали на присутствие TNF- α и INF- γ .

Анти-р17-антитела в указанных выше концентрациях также использовали для блокировки связывания р17 с клеточным рецептором, экспрессированным Т- и В-лимфоцитами. Способность антител блокировать связывание в системе р17/рецептор

оценивали с помощью проточной цитометрии.

Среди различных антител, полученных в примере 6, лишь одно, названное MBS-3, оказалось способным блокировать влияние p17 на секрецию провоспалительных цитокинов. Фактически в клетках PBMC, стимулированных IL-2 и p17, снижалась продукция

5 INF- γ и TNF- α до значений, сравнимых со значениями, полученными в культурах, стимулированных только IL-2, в том случае, когда моноклональное антитело MBS-3 добавляют в культуру в начале стимуляции с митогеном (данные не представлены).

Добавление MBS-3 в культуры, стимулированные IL-2 плюс IL-4 и p17, полностью блокирует способность вирусного белка к реверсии ингибиторной активности IL-4.

10 Другие моноклональные анти-p17-антитела и среди них особенно одно, обозначенное МК-1, не обладают какой-либо способностью к нейтрализации. Кроме того, добавление MBS-3 в начале стимуляции совместно с митогеном не препятствует, в отсутствие p17, синтезу провоспалительных цитокинов и ингибирующему действию IL-4. Наконец, MBS-3 (но не МК-1) полностью блокирует связывание p17 с его рецептором дозозависимым

15 образом.

Пример 8

Картирование эпитопа

Нейтрализующее моноклональное анти-p17-антитело MBS-3 охарактеризовывали по связыванию со специфическими эпитопами p17 с помощью метода картирования эпитопов.

20 На основе известной последовательности p17 штамма HB10 вируса ВИЧ-1 синтезировали 62 пептида длиной в 10 аминокислот. Такие пептиды отражают p17 полной длины и перекрывают друг друга со сдвигом на две аминокислоты вдоль молекулы p17.

В качестве положительного контроля синтеза пептидов и реактивности антител также синтезировали полипептид EAENLKKEYFN (однобуквенная кодировка) INF- γ , который

25 распознается моноклональным антителом IGMB-15 (Caruso A., L.Tiberio, C. De Rango, C.Bonfanti, G.Flamminio, G.Gribaudo, E.Monti, E.Viani, N.Manca, G.Garotta, S.Landolfo, A.Balsari и A.Turano, 1993, J.Immunol. 150: 1029-1035).

Пептиды синтезировали с использованием набора SPOT Synthesis (Genosys Biotechnologies, Pampisfors, Great Britain) на клеточной мембране площадью 8×12 см, дериватизированной димером β -аланина с экспонированными наружу аминокислотными

30 (NH₂). Реакционную способность моноклональных антител относительно пептидов оценивали в соответствии с инструкциями производителей.

Затем идентифицировали область связывания MBS-3 в последовательности между положениями 9 и 22 белка p17 (SEQ ID NO: 2). Аналогичный пептид также распознается

35 двумя другими нейтрализующими анти-p17-антителами в твердофазном тесте ELISA, в то время как другие анти-p17-антитела, не обладающие нейтрализующей способностью, не распознают такой пептид.

Кроме этого в конкурентном тесте ELISA вышеупомянутый пептид оказался эффективным веществом в связывании антитела MBS-3 с p17, абсорбированным в

40 твердой фазе.

Пример 9

Аффинная хроматография анти-p17-антител

2 мг пептида с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 2 и дополнительным остатком лизина (Lys) на C-конце связывали с 2 мл сшивающего геля Sulfolink (Pierce, Rockford, IL), следуя стандартному протоколу, рекомендованному Pierce. Аффинную

45 колонку присоединяли к прибору FPLC (Pharmacia) и уравнивали фосфатным буферным раствором (PBS). Гибридомные супернатанты, содержащие моноклональные анти-p17-антитела MBS-3, пропускали через колонку с объемной скоростью 0,1 мл/мин, и связанные антитела элюировали с такой же скоростью 0,1М глицина, pH 3,0. Было

50 установлено, что элюированные антитела специфически распознают белок p17 в вестерн-блоттинг-анализе (данные не представлены).

<212> PRT

<213> HIV

5

<400> 2

Ser Gly Gly Glu Leu Asp Arg Trp Glu Lys Ile Arg Leu Arg
 10 1 5 10

<210> 3

15 <211> 8

<212> PRT

<213> HIV

20

<400> 3

Pro Gly Gly Lys Lys Lys Tyr Lys
 25 1 5

Формула изобретения

1. Полипептид, предназначенный для использования в качестве вакцины или
 30 прививочного материала, способный вызывать продукцию анти-p17-антитела, способного
 ингибировать провоспалительные биологические функции белка p17 ВИЧ, имеющий
 первую аминокислотную последовательность, соответствующую нейтрализующему эпитопу
 белка p17 вируса ВИЧ, представляющую собой последовательность NH₂-X¹-Gly-X²-X³-Leu-
 Asp-X⁴-Trp-Glu-X⁵-Ile-X⁶-Leu-Arg-COOH (SEQ ID NO: 1), соответствующую положениям 9-22
 35 белка p17 ВИЧ, где X¹ является аминокислотным остатком, выбранным из Ser и Arg; X²
 является аминокислотным остатком, выбранным из Gly, Glu и Ser; X³ является
 аминокислотным остатком, выбранным из Glu, Lys, Asp и Arg; X⁴ является аминокислотным
 остатком, выбранным из Arg, Ala, Lys, Thr, Ser, Glu, Asp и Gln; X⁵ является аминокислотным
 40 остатком, выбранным из Lys, Arg и Ser; а X⁶ является аминокислотным остатком,
 выбранным из Arg и Gln, и вторую аминокислотную последовательность, которая придает
 растворимость полипептиду и представляет собой пептид, соответствующий положениям
 23-30 белка p17 ВИЧ, и которая непосредственно связана с аминокислотным остатком в
 карбоксиконцевом положении указанной аминокислотной последовательности
 45 нейтрализующего эпитопа белка p17 ВИЧ.

2. Полипептид по п.1, в котором первая аминокислотная последовательность
 представляет собой NH₂-Ser-Gly-Gly-Glu-Leu-Asp-Arg-Trp-Glu-Lys-Ile-Arg-Leu-Arg-COOH
 (SEQ ID NO: 2).

3. Полипептид по п.1, в котором вторая аминокислотная последовательность,
 50 непосредственно связанная с аминокислотным остатком в карбоксиконцевом положении
 указанной аминокислотной последовательности нейтрализующего эпитопа белка p17 ВИЧ,
 представляет собой последовательность -Pro-Gly-Gly-Lys-Lys-Lys-Tyr-Lys-COOH (SEQ ID
 NO: 3).

4. Полипептид, способный вызывать продукцию анти-p17-антитела, способного ингибировать провоспалительные биологические функции белка p17 ВИЧ, охарактеризованный в любом из пп.1-3, отличающийся тем, что он конъюгирован с носителем.

5. Полипептид по п.4, отличающийся тем, что его конъюгируют с носителем посредством дополнительного остатка цистеина (Cys) или дополнительного дипептида -Nleu-Cys в карбоксиконцевом положении.

6. Полипептид, способный вызывать продукцию анти-p17-антитела, способного ингибировать провоспалительные биологические функции белка p17 ВИЧ, охарактеризованный в любом из пп.1-5, отличающийся тем, что он имеет форму разветвленного пептида.

7. Композиция фармацевтической вакцины или прививочного материала для выработки иммунного ответа, способного нейтрализовать биологическую активность белка p17 ВИЧ, содержащая 100 мкг/кг полипептида по любому из пп.1-6 и фармацевтически приемлемый носитель.

8. Применение полипептида по любому из пп.1-5 для приготовления лекарственного средства, способного вызывать иммунный ответ, нейтрализующий биологическую активность белка p17 вируса ВИЧ у субъекта, которому вводят указанное лекарственное средство.

9. Применение полипептида по любому из пп.1-5 в качестве специфического реагента в тесте на обнаружение присутствия нейтрализующих анти-p17-антител вируса ВИЧ в образце биологического материала.

10. Применение полипептида по любому из пп.1-5 в качестве специфического реагента для очистки нейтрализующих анти-p17-антител ВИЧ из образца биологического материала.

11. Моноклональное или поликлональное антитело, направленное против белка p17 ВИЧ, распознающее эпитоп, имеющий последовательность, определяемую в любом из пп.1 и 2, и способное нейтрализовать биологическую активность белка p17 вируса ВИЧ и специфически распознавать нейтрализующий эпитоп белка p17 ВИЧ, причем указанный нейтрализующий эпитоп представляет собой аминокислотную последовательность, соответствующую положениям 9-22 белка p17 ВИЧ.

12. Антитело по п.11, в котором указанная аминокислотная последовательность представляет собой последовательность -X¹-Gly-X²-X³-Leu-Asp-X⁴-Trp-Glu-X⁵-Ile-X⁶-Leu-Arg- (SEQ ID NO: 1), в которой X¹ представляет собой аминокислотный остаток, выбранный из Ser и Arg; X² представляет собой аминокислотный остаток, выбранный из Gly, Glu и Ser; X³ представляет собой аминокислотный остаток, выбранный из Glu, Lys, Asp и Arg; X⁴ представляет собой аминокислотный остаток, выбранный из Arg, Ala, Lys, Thr, Ser, Glu, Asp и Gln; X⁵ представляет собой аминокислотный остаток, выбранный из Lys, Arg, и Ser; а X⁶ представляет собой аминокислотный остаток, выбранный из Arg и Gln.

13. Антитело по п.12, где указанная аминокислотная последовательность представляет собой последовательность -Ser-Gly-Gly-Glu-Leu-Asp-Arg-Trp-Glu-Lys-Ile-Arg-Leu-Arg- (SEQ ID NO: 2).

14. Антитело по любому из пп.11-13, представляющее собой иммуноглобулиновый фрагмент F(ab')₂, Fab, Fab' или Fv.

15. Фармацевтическая композиция для ингибирования провоспалительных биологических функций белка p17 ВИЧ, содержащая 0,5-20 мг/мл антитела по любому из пп.11-14 и фармацевтически приемлемый носитель.

16. Применение антитела по любому из пп.11-14, полученного с использованием антигена, охарактеризованного в п.1, для приготовления терапевтического или профилактического лекарственного средства, способного ингибировать иммуностимулирующую активность белка p17 вируса ВИЧ, продуцируемого в ходе ВИЧ-инфицирования.

17. Применение антитела по любому из пп.11-14, полученного с использованием антигена, охарактеризованного в п.1, в качестве специального реагента в тесте на

обнаружение присутствия белка р17 вируса ВИЧ в образце биологического материала.

Приоритет по пунктам:

07.08.2001 - по п.2;

02.11.2001 - по пп.1, 3-17.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50