



(19) **RU** <sup>(11)</sup> **2 181 379** <sup>(13)</sup> **C2**  
 (51) МПК<sup>7</sup> **C 12 N 15/48, C 07 K 14/16, 16/10, A 61 K 39/44, 39/395**

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО  
 ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

(21), (22) Заявка: 96108781/13, 12.09.1994  
 (24) Дата начала действия патента: 12.09.1994  
 (30) Приоритет: 11.09.1993 EP 93 114 631.0  
 (43) Дата публикации заявки: 20.04.1999  
 (46) Дата публикации: 20.04.2002  
 (56) Ссылки: ALLAWAY et al. Aids Presearch and Human Retroviruses, 1993, v.9, n.7, p.581-587. JAVANERIAN et al. Science, 1990, v.250, n.4987, p.1590-1593. EP 0298280 A1, 11.01.1989. EP 0222415 A1, 20.05.1987. HAUROWITZ F. Immunochemistry and the biosynthesis of antibodies. Inter science publishers, a division of John Wiley Sons, New York - London - Sydney. 1968, p.8-34.  
 (85) Дата перевода заявки РСТ на национальную фазу: 11.04.1996  
 (86) Заявка РСТ: EP 94/03039 (12.09.1994)  
 (87) Публикация РСТ: WO 95/07354 (16.03.1995)  
 (98) Адрес для переписки: 103735, Москва, ул. Ильинка, 5/2, ООО "Союзпатент", А.П.Агурееву

(71) Заявитель:  
 ПОЛИМУН САЙЕНТИФИК  
 ИММУНОБИОЛОГИШЕ ФОРШУНГ ГМБХ (АТ)  
 (72) Изобретатель: Херманн КАТИНГЕР (АТ),  
 Томас МУСТЕР (АТ)  
 (73) Патентообладатель:  
 ПОЛИМУН САЙЕНТИФИК  
 ИММУНОБИОЛОГИШЕ ФОРШУНГ ГМБХ (АТ)  
 (74) Патентный поверенный:  
 Агуреев Александр Павлович

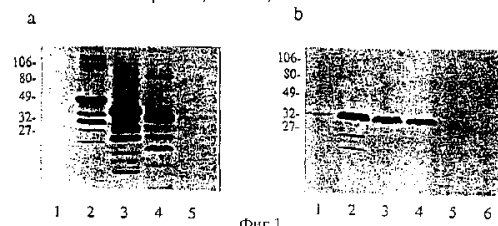
RU 2 181 379 C2

RU 2 181 379 C2

(54) ПЕПТИД (ВАРИАНТЫ) И СПОСОБ ЕГО ПРОИЗВОДСТВА, ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЕ СРЕДСТВО, АНТИТЕЛО И СПОСОБ ЕГО ПРОИЗВОДСТВА

(57) Изобретение относится к биотехнологии и иммунологии и может быть использовано для получения нейтрализующих антител к различным штаммам и клиническим изолятам ВИЧ-1. Пептид имеет аминокислотную последовательность ELDKQAS, LELDKQAS, ELDNQAS, ELNQAS, LELDNQAS или LELNQAS и способствует образованию антител. Пептид может быть связан с носителем, представляющим собой вирус или вирусный белок. Пептид, связанный с носителем, получают рекомбинантным путем. Антитело, имеющее ВИЧ-1 нейтрализующую активность и секретируемое поверхностью

слизистой оболочки, получают путем иммунизации человека или животного. Изобретение позволяет разработать фармацевтическое средство, способствующее образованию антител к штаммам ВИЧ-1 и/или клиническим изолятам. 6 с. и 11 з.п.ф-лы, 9 ил., 1 табл.





(19) **RU** <sup>(11)</sup> **2 181 379** <sup>(13)</sup> **C2**

(51) Int. Cl.<sup>7</sup> **C 12 N 15/48, C 07 K 14/16, 16/10, A 61 K 39/44, 39/395**

RUSSIAN AGENCY  
FOR PATENTS AND TRADEMARKS

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

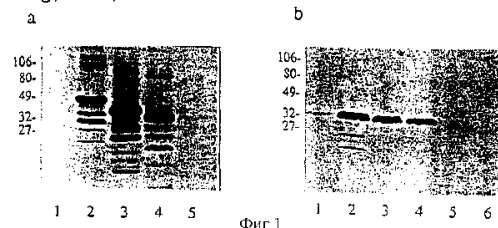
(21), (22) Application: 96108781/13, 12.09.1994  
 (24) Effective date for property rights: 12.09.1994  
 (30) Priority: 11.09.1993 EP 93 114 631.0  
 (43) Application published: 20.04.1999  
 (46) Date of publication: 20.04.2002  
 (85) Commencement of national phase: 11.04.1996  
 (86) PCT application:  
 EP 94/03039 (12.09.1994)  
 (87) PCT publication:  
 WO 95/07354 (16.03.1995)  
 (98) Mail address:  
 103735, Moskva, ul. Il'inka, 5/2, 000  
 "Sojuzpatent", A.P.Agureevu

(71) Applicant:  
 POLIMUN SAJENTIFIK IMMUNOBIOLOGIShe  
 FORShUNG GMBKh (AT)  
 (72) Inventor: Khermann KATINGER (AT),  
 Tomas MUSTER (AT)  
 (73) Proprietor:  
 POLIMUN SAJENTIFIK IMMUNOBIOLOGIShe  
 FORShUNG GMBKh (AT)  
 (74) Representative:  
 Agureev Aleksandr Pavlovich

(54) **PEPTIDE (VARIANTS) AND METHOD OF ITS PRODUCTION, PHARMACEUTICAL AGENT, ANTIBODY AND METHOD OF ITS PRODUCTION**

(57) Abstract:  
 FIELD: immunology, biotechnology, peptides, pharmacy. SUBSTANCE: peptide shows the following amino acid sequence: ELDKWAS, LELDKWAS, ELDNWAS, ELNKWAS, LELDNWAS or LELNKWAS and promotes to the formation of antibodies. Peptide can be bound with a carrier as virus or viral protein. Peptide bound with a carrier is prepared by recombinant method. Antibody with HIV-1-neutralizing activity and secreted by mucosa envelope surface is prepared by immunization of human or animal. Invention ensures to develop a pharmaceutical agent promoting to the

formation of antibodies to strains HIV-1 and/or clinical isolates. Invention can be used for preparing neutralizing antibodies raised to different strains and clinical isolates of HIV-1. EFFECT: improved method of peptide and antibody production. 17 cl, 9 dwg, 1 tbl, 7 ex



RU 2 181 379 C2

RU 2 181 379 C2

Изобретение относится к пептидам, способствующим образованию нейтрализующих антител к различным штаммам и клиническим изолятам ВИЧ-1, а также к создаваемым пептидами антителам и, кроме того, к комбинациям пептидов - носитель, эффективно переносящим эти пептиды в иммунную систему. Более конкретно, данное изобретение относится к созданию вакцины против ВИЧ-1.

Синдром приобретенного иммунодефицита (СПИД) является последней стадией клинического проявления долговременной устойчивой инфекции вирусом иммунодефицита человека типа 1 (ВИЧ-1). Направленные на вирус и на инфицированные вирусом клетки иммунные реакции в ходе устойчивой инфекции обычно не способны прекратить инфекцию. Вакцины могут создать такие иммунные реакции, которые способны предотвратить возникновение устойчивой инфекции или даже предотвратить ее развитие в СПИД. Большинство стратегий вакцинации против ВИЧ-1 направлены на его поверхностный гликопротеин gp160, состоящий из gp120 и gp41 и ответственный за связывание вируса с клеточным рецептором CD 4 и за последующий запуск направленной на слияние активности.

Однако, что касается gp160, то некоторые наблюдаемые явления свидетельствуют о неприемлемости в качестве иммуногена полного gp160 или gp120. Опыты *in vitro* показывают, что синергизм между gp120 и gp120-специфичными антителами блокирует активность Т-клеток человека (Mittler и др., *Science* (1989) 245, 1380). Кроме того, известно, что ряд антигенных доменов в gp160 индуцируют антитела, усиливающие инфекцию ВИЧ-1 (Jiang и др., *J. Exp. Med.* (1991) 174, 1557).

Применение в качестве иммуногенов синтетических пептидов имеет целый ряд преимуществ. Создаваемые синтетическими пептидами антитела обладают заданной специфичностью и в случае вирусов могут быть подобраны пептиды, образующие на поверхности вирионов целые структуры. Синтетические полипептиды интересны также с точки зрения их способности индуцировать реакцию антитела, не наблюдаемую в обычных условиях. К примеру, можно индуцировать нейтрализующие антитела с более широкой, чем у целостных белков, реакционной способностью (Green др., *Cell* (1982) 28, 477).

Кроме того, пептид, содержащий часть V3 петли gp120 из ВИЧ-1 изолята (ВИЧ-1 IIIb), как показано, индуцирует антитела, защищающие шимпанзе от вируса при искусственном заражении животного тем же ВИЧ-1 изолятом (Emini и др., *Nature* (1992) 355, 728).

Поскольку синтетические пептиды сами по себе обладают слабой иммуногенностью, их необходимо соединить с молекулами, создающими синергическое действие, например столбнячным токсидом или гемоглицином лимфы улитки (Bittle и др., *Nature* (1982) 298, 30). Другая возможность заключается в клонировании небольших пептидов в виде слитых белков с глутатион-S-трансферазой из *Schistosoma japonicum* (Fikrig и др., *Science* (1990) 250,

553).

В качестве векторов для иммуногенов могут быть использованы также и вирусы, например: коровьей оспы, полиомиелита или гриппа. Кролики, зараженные рекомбинантным вирусом коровьей оспы, содержащим последовательности из поверхностного антигена вируса гепатита В (HBsAg), гликопротеина вируса простого герпеса и гемагглютинаина вируса гриппа, продуцируют антитела ко всем трем чужеродным антигенам (Perkus и др., *Science* (1985) 229, 981). Более того, химерный вирус полиомиелита, экспрессирующий эпитоп из gp41 ВИЧ-1, успешно индуцирует у кроликов нейтрализующие антитела к ВИЧ-1 (Evans и др., *Nature* (1989) 339, 385).

Совсем недавно стало возможным изменять *in vitro* мутагенезом геном вируса гриппа (Enami и др., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1990) 87, 3802). С помощью подобной технологии методами генной инженерии удалось создать устойчивый ослабленный вирус гриппа А (Muster и др., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1991) 88, 5177).

Преимущества вируса гриппа в данном контексте заключаются в доступности многих вариантов, что позволяет проводить повторные вакцинации. Кроме того, вирус гриппа индуцирует сильные секреторные и клеточные иммунные реакции, которые могут иметь успех при создании анти-ВИЧ-1 вакцины.

Цель настоящего изобретения состоит в создании пептидных последовательностей, которые всего лишь минимально иммуногенны в сравнении с целостным gp160. Такие пептидные последовательности могут быть использованы для создания антител, проявляющих нейтрализующую активность относительно различных штаммов и/или клинических изолятов ВИЧ-1 и/или подавляющих слияние клеток млекопитающего, пораженных ВИЧ-1.

Еще одна цель изобретения заключается в создании стратегии индуцирования секреторных антител, секретируемых из слизистой поверхности и направленных на вирус ВИЧ-1 и на инфицированные вирусом клетки. Согласно изобретению предполагается, что созданные в ткани слизистой анти-ВИЧ-1 IgA антитела станут оружием, особенно мощным для профилактики и предотвращения инфицирования ВИЧ-1 индивидуумов из группы риска, поскольку многие вирусные инфекции, включая ВИЧ-1, передаются через поверхность слизистой дыхательных путей, желудочно-кишечного тракта и половых путей.

Указанные цели достигаются получением небольших пептидов из семи или восьми аминокислот, полученных либо химическим синтезом, либо микробиологическими методами. Рекомендуются, чтобы пептиды происходили из последовательностей нуклеиновых кислот, кодирующих Glu Leu Asp Lys Trp Ala Ser (=ELDKWAS в однобуквенном коде), Leu Glu Leu Asp Lys Trp Ala Ser (LELDKWAS), Glu Leu Asn Lys Trp Ala Ser (ELNKWAS), Leu Glu Leu Asn Lys Trp Ala Ser (LELNKWAS), Glu Leu Asp Asn Trp Ala Ser (ELDNWAS) или Leu Glu Leu Asp Asn Trp Ala Ser (LELDNWAS).

По меньшей мере одна, но предпочтительно все шесть вышеупомянутых

аминокислотных последовательностей (далее называются "указанными шестью АКП") могут быть успешно введены в иммунную систему, чтобы индуцировать образование и выделение антител, проявляющих нейтрализующую активность относительно ВИЧ-1 штаммов и/или подавляющих клеточное слияние, вызываемое этими штаммами.

Основная цель изобретения заключается в создании многообещающей анти-ВИЧ-1 вакцины, основанной на препарате, включающем по меньшей мере один, предпочтительно смесь всех шести вышеупомянутых пептидов. Характерные признаки и преимущества изобретения приводятся ниже.

В рекомендуемом воплощении изобретения аминокислотную последовательность Glu Leu Asp Lys Trp Ala (ELDKWA), определяющую последовательность эпитопа из моноклонального антитела человека 2F5 (получено из гибридомной клеточной линии 2F5, PHLS депонент 90091704; депонирован 09/17/90), соединяют с Ser или с Leu и Ser одновременно, расположенными рядом с ELDKWA последовательностью в gp41, определяющей 2F5 эпитоп, с образованием пептидных последовательностей Glu Leu Asp Lys Trp Ala Ser (ELDKWAS) и Leu Glu Leu Asp Lys Trp Ala Ser (LELDKWAS) соответственно и введение в молекулу носителя, а именно область детерминанты В из НА вируса гриппа.

Модифицированный "химерный" НА слитый белок, несущий чужеродную аминокислотную последовательность ELDKWAS или LELDKWAS, очень эффективно индуцирует антитела, направленные на указанную ELDKWAS или LELDKWAS последовательность, при введении белка, предпочтительно в виде инъекции в иммунную систему млекопитающего, в частности человека. Полученные таким путем антитела проявляют нейтрализующую активность относительно различных штаммов и/или клинических изолятов ВИЧ-1.

Тем не менее оказалось, что вследствие известного полиморфизма ВИЧ-1 мутации вируса могут происходить даже в пределах высококонсервативной (L)ELDKWAS аминокислотной последовательности gp41, соответствующей аминокислотам 661-668 (LELDKWAS) или 662-668 (ELDKWAS) из ВИЧ-1 изолята BH10. Нумерация нуклеотидов и аминокислот, применяемая в данном описании, соответствует нумерации gp160 из ВИЧ-1 изолята BH10, применяемой согласно базы данных Лос Алмоса (Myers и др., Data Base Human Retrovirus and Aids). Особенно подвержены мутации Asp (D) и/или Lys (K) аминокислоты, находящиеся в центре указанной последовательности, с уменьшением вероятности нейтрализации вируса антителами, несущими 2F5 эпитоп. Такой нежелательный вариант механизма "побега вируса" можно успешно избежать применением тех пептидов настоящего изобретения, в которых либо Asp (D), либо соседний Lys (K) заменены аспарагином (N).

Для приготовления фармацевтического средства, предназначенного для индуцирования антител, проявляющих нейтрализующую активность относительно

различных штаммов и/или клинических изолятов ВИЧ-1 и/или подавляющих слияние пораженных ВИЧ-1 клеток, может быть использован хотя бы один, предпочтительно смесь всех шести пептидов.

В другом варианте для изготовления фармацевтического средства, предназначенного для индуцирования анти-ВИЧ-1 IgA антител, секретлируемых поверхностью слизистой оболочки, предпочтительно при введении млекопитающему через нос, могут быть использованы те же пептиды либо в виде каждого пептида по отдельности, либо в смеси с хотя бы с одним другим пептидом.

В еще одном варианте изобретения по меньшей мере один из шести указанных пептидов соединяют с носителем. Подобным носителем может служить, к примеру, вирус в его ослабленной и/или рекомбинантной форме. С успехом могут быть использованы вирус гриппа, бакуловирус или вирус коровьей оспы. Присоединение небольших пептидов к носителю, такому как, например, вирусный белок или вирус целиком повышает эффективность индуцирования антитела после введения в иммунную систему таких химерных комбинаций пептид - носитель или химерных слитых белков.

Особенно успешным является применение каждого из вышеприведенных пептидов в виде слитого белка с вирусным белком в качестве носителя, причем по меньшей мере одна аминокислотная последовательность по изобретению замещает по меньшей мере одну часть вирусного белка-носителя или встроена в по меньшей мере одну из областей детерминанты вирусного белка. Данный признак, таким образом, представляет важное воплощение изобретения. В рекомендуемом варианте указанный вирусный белок является гемагглютинином (НА) вируса гриппа, нейраминидазой (NA) вируса гриппа или поверхностным антигеном вируса гепатита В. В другом варианте источником белка может служить бакуловирус (предпочтительно рекомбинантный) или вирус коровьей оспы.

Настоящее изобретение относится также к применению любого из вышеохарактеризованных пептидов, состоящих из семи или восьми аминокислот, и/или комбинаций пептид - носитель, или слитых белков для приготовления фармацевтического средства, предназначенного для создания или индуцирования антител, проявляющих нейтрализующую активность относительно различных штаммов и/или клинических изолятов ВИЧ-1 и/или подавляющих слияние пораженных ВИЧ-1 клеток. Если более конкретно, то поставлена задача создания эффективной вакцины, основанной на по меньшей мере одном, предпочтительно смеси всех шести указанных пептидов и/или шести указанных пептидов, соединенных с носителем, для профилактической обработки индивидуумов, которым угрожает заражение ВИЧ-1, и/или для лечения инфицированных ВИЧ-1 больных, особенно для предотвращения развития инфекции в СПИД.

В еще одном рекомендуемом варианте указанные шесть пептидов и/или указанные шесть пептидов, соединенные с носителем, применяют для изготовления

фармацевтических препаратов, которые после введения в иммунную систему млекопитающего приводят к индуцированию анти-ВИЧ-1 IgA антител, секретируемых с поверхности слизистой большого животного или человека. В этом случае рекомендуется введение через нос.

Соответственно, указанные шесть пептидов и/или комбинации пептид - носитель настоящего изобретения могут быть также использованы для приготовления фармацевтического средства, предназначенного для профилактики или предотвращения инфекции ВИЧ-1 в группах риска инфицирования ВИЧ-1.

По всей видимости, именно данный характерный признак настоящего изобретения позволяет надеяться на то, что путем индуцирования анти-ВИЧ-1 специфичных секреторных IgA антител на поверхности слизистой оболочки согласно настоящему изобретению дается медицинский инструмент, с помощью которого эффективно атакуется вирусная агрессия уже на первых этапах проникновения вируса в организм млекопитающего. Полагают, что способы-прототипы лечения ВИЧ-1 инфицированных больных по меньшей мере частично не способны защитить больного потому, что охота за вирусом происходит в кровеносной системе, т.е. после широкого распространения вируса в гуморальной системе.

В рекомендуемом варианте указанное антитело является секреторным антителом, предпочтительно анти-ВИЧ-1 IgA антителом, которое с успехом секретируется поверхностью слизистой оболочки.

Кроме того, настоящее изобретение относится также к способу получения любого из шести указанных пептидов либо микробиологическими, либо химическими методами.

В одном из вариантов указанные шесть пептидов синтезируют химически по стандартным биохимическим методикам, предпочтительно с помощью синтезатора пептидов модели 431A фирмы Эпплайд Биосистемс.

В другом варианте указанные аминокислотные последовательности получают микробиологическим способом, включающим стадии встраивания нуклеотидной последовательности, выбранной из группы, состоящей из:

а) нуклеотидной последовательности, соответствующей одному из шести указанных пептидов,

б) нуклеотидной последовательности, гибридной с одной из нуклеотидных последовательностей по пункту а),

с) нуклеотидной последовательности, полученной из одной из нуклеотидных последовательностей по пункту а) путем вырождения

в геном микроорганизма-хозяина, ведущего экспрессию генома, применением стандартной технологии микробиологического культивирования и выделением по меньшей мере одного, предпочтительно нескольких указанных пептидов.

Химерные слитые белки или комбинации пептид - носитель могут быть получены способом, включающем соединение аминокислотной последовательности,

выбранной из группы, состоящей из шести указанных пептидов, с носителем, предпочтительно вирусом или вирусным белком химическими или микробиологическими методами.

5 В рекомендуемом варианте способ получения шести указанных пептидов, связанных с носителем, предпочтительно вирусом или вирусным белком, является микробиологическим способом и состоит из 10 стадий присоединения нуклеотидной последовательности, выбранной из группы, включающей:

а) нуклеотидную последовательность, соответствующую одной из аминокислотных последовательностей указанных шести пептидов,

б) нуклеотидную последовательность, гибридную с одной из нуклеотидных последовательностей по пункту а),

с) нуклеотидную последовательность, 20 полученную из одной из нуклеотидных последовательностей по пункту а) путем вырождения

к нуклеотидной последовательности, соответствующей аминокислотной последовательности носителя, переноса 25 соединенной нуклеотидной последовательности в микроорганизм-хозяин, проведения экспрессии соединенной последовательности применением стандартной микробиологической технологии и выделения по меньшей мере одного, предпочтительно нескольких указанных пептидов, связанных с носителем.

В еще одном варианте способ получения указанных шести пептидов, связанных с носителем, предпочтительно вирусом или вирусным белком, отличается тем, что по 35 меньшей мере одну нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, включающей:

а) нуклеотидную последовательность, соответствующую одной из аминокислотных последовательностей указанных шести пептидов,

б) нуклеотидную последовательность, гибридную с одной из нуклеотидных последовательностей по п. а),

с) нуклеотидную последовательность, 45 полученную из одной из нуклеотидных последовательностей по пункту а) путем вырождения

соединяют с нуклеотидной последовательностью, соответствующей аминокислотной последовательности

50 вирусного белка в качестве носителя, с замещением в результате по меньшей мере части нуклеотидной последовательности, соответствующей аминокислотной последовательности вирусного белка или

55 встраиванием в по меньшей мере один участок указанной последовательности, соответствующий области детерминанты вирусного белка.

В характерном воплощении изобретения применяемый вирусный белок выбирают из группы, включающей: гемагглютинин вируса гриппа, нейраминидазу вируса гриппа и поверхностный антиген вируса гепатита В, а в другом характерном варианте в качестве микроорганизма-хозяина применяют вирус гриппа, бакуловироз или вирус коровьей оспы, предпочтительно каждый из них в рекомбинантной форме.

Встраивание последовательностей шести указанных пептидов в область детерминанты В в HA штаммов вируса гриппа, отличных от WSN, на который в основном и происходит ссылка в нижеследующих примерах, приводит в равной степени к слитым белкам и/или химерным вирусам, создающим нейтрализующие анти-ВИЧ-1 антитела и предотвращающим направляемое ВИЧ-1 клеточное слияние.

Введение этих же последовательностей в другие участки HA вируса гриппа или нейраминидазу (NA) вируса гриппа также приводит к слитым белкам пептид-носитель и/или химерным вирусам, создающим нейтрализующие анти-ВИЧ антитела и предотвращающим направляемое ВИЧ-1 клеточное слияние.

Настоящее изобретение далее дополнительно разъясняется и иллюстрируется следующими примерами, которые ни в коей мере не ограничивают объема настоящего изобретения.

Пример 1. Картирование эпитопа

Эпитоп моноклонального антитела 2F5 идентифицируют иммуноблоттингом по методике, приведенной в работе Towbin и др., Proc. Natl. Acad. Sci. США (1979) 76, 4850. Пептиды перекрывающихся фрагментов из gp41 ВИЧ-1 изолята BH10 клонируют в виде пептидов, слитых с глутатионтрансферазой. Различные слитые пептиды получены путем гибридизации соответствующих gp41 олигонуклеотидов, клонированных между Bam H1 и Eco R1 сайтами плазмиды pGEX-2T (Фармация). Рекомбинантными плазмидами трансформируют E. coli штамм DH5, и экспрессию слитых белков индуцируют изопропилтиогалактозидом (ИПТГ). Экстракт E. coli затем очищают на колонках глутатион-сефарозы 4B, переносят на натрийдодецилсульфат-полиакриламидные гели, разделяют электрофорезом, и экспрессию белка анализируют окрашиванием серебром и иммуноблоттингом (фиг. 1). Полученные иммуноблоттингом данные показывают, что эпитоп моноклонального антитела 2F5 человека включает аминокислотную последовательность ELDKWA, соответствующую в gp160 аминокислотам 662-667.

Фиг. 1 иллюстрирует специфичность моноклонального антитела 2F5 человека (см. пример 1).

Фиг. 2 иллюстрирует конструкцию химерных гемагглютининов, несущих последовательность 2F5-эпитопа (см. пример 2).

На фиг. 3 показаны титры в ферментном иммуносорбентном тесте (ELISA) для антисыворотки мыши, иммунизированной химерным вирусом гриппа (см. пример 3).

На фиг. 4 показаны титры в ELISA мыши, иммунизированной клетками, инфицированными рекомбинантным бакуловирусом (см. пример 5).

На фиг. 1 приведены результаты иммуноблоттинга пептидов, слитых с перекрывающимися фрагментами из gp160 ВИЧ-1 (изолят BH10). В отличие от конструкций, содержащих аминокислоты 597-677 (полоса 2), 634-677 (полоса 3) и 648-677 (полоса 4) и реагирующих с антителом 2F5, слитый белок, содержащий

аминокислоты 667-677 (полоса 5), не дает положительной реакции. Это является прямым указанием на то, что эпитоп моноклонального антитела 2F5 образован аминокислотами в пределах последовательности в положении 648-667 в gp160. На основании этих результатов перекрывающиеся 6-мерные пептиды из этой области сливают с глутатион-S-трансферазой.

Как видно из фиг. 1b, пептид, содержащий аминокислотную последовательность LEU ASP LYS TRP ALA (аминокислоты 662-667, полоса 2), отличается высокой реакционной способностью относительно антитела 2F5, в то время как у пептидов, содержащих аминокислотную последовательность LEU ASP LYS TRP ALA SER (LDKWAS, аминокислоты 663-668, полоса 3) или ASP LYS TRP ALA SER LEU (DKWASL, аминокислоты 664-669, полоса 4), реакционная способность относительно моноклонального антитела понижена. Пептид, содержащий аминокислотную последовательность LEU GLU LEU ASP LYS TRP (LELDKW, аминокислоты 661-666, полоса 1), не проявляет значительной реакционной способности. Приведенные данные показывают, что эпитоп моноклонального антитела включает аминокислотную последовательность LEU LEU ASP LYS TRP ALA (ELDKWA), соответствующую аминокислотам 662-667 в gp160 из ВИЧ-1 (изолят BH10). В данном контексте как синтетический пептид, соответствующий последовательности данного эпитопа, так и слитый белок, содержащий эту последовательность, оказались способными подавлять нейтрализацию, происходящую при участии 2F5 антитела.

Пример 2. Конструирование плазмид и химерных вирусов гриппа.

Все приемы генной инженерии осуществлены согласно стандартным методикам, приведенным в издании: Sambrook и др. (1989) "Molecular Cloning", Laboratory Manual, Коулд Спринг Харбор Лэборатори Пресс, Нью-Йорк. Как показано, на фиг. 2, gp41-последовательности Leu Glu Leu Asp Lys Trp Ala Ser (LELDKWAS) или Glu Leu Asp Lys Trp Ala Ser (ELDKWAS) вводят в область детерминанты В в HA вируса WSN гриппа. Плазмиды pHA-ELDKWAS и pHA-1 ELDKWAS конструируют заменой Pst I-Hind III фрагмента плазмиды pT3/WSN-HAml, описанной Li и др. (Proc. Natl. Acad. Sci. США 90, 5214-5218 (1993)), ПЦР продуктом, полученным применением pT3/WSN-HAml в качестве матрицы и смыслового и антисмыслового праймеров, происходящих из вируса WSN HAml гриппа, причем антисмысловый праймер дополнительно содержит 21 или 24 нуклеотидную вставку, соответствующую положению 1981 или 1984-2004 в gp160. Аналогичным путем получены плазмиды pHA-ELNKWAS, pHA-LELNKAS, pHA-ELDNWAS и pHA-1 ELDNWS.

Последовательность WSN HA приводится в работе Hiti и др. (J. Virol. 41 730-734 (1982)), а последовательность gp160 содержится в базе данных Суисспорт, поступление ENVSHTV10. Трансфекцию PHK, происходящую из этой плазмиды, в MDBK клетки, отбор и получение химерных вирусов

осуществляют согласно Enami и др. (Proc. Natl. Acad. Sci. США 87, 3802-3805 (1990)) с модификациями, приведенными Enami и Palese (J. Virol. 65. 2711-2713 (1991)).

Пример 3. Иммунизация и реакция антител у мышей, иммунизированных химерными вирусами гриппа.

Мышей линии OF-1 иммунизируют химерным вирусом ELDKWAS-гриппа (мыши M1, M2, M3, M4) или вирусом LEELDKWAS-гриппа (мышь M5). Вначале мышей иммунизируют  $10^2$  TCID<sub>50</sub> через нос (IN) с последующей бустер-иммунизацией ч.н.  $5 \cdot 10^5$  TCID<sub>50</sub> спустя 6 недель, иммунизацией внутрибрюшинно (IP) 20 мкг очищенного на сахарозе живого вируса через 3 недели и наконец бустер-инъекцией 20 мкг НДС-денатурированного вируса в неполном адьюванте Фрейнда с интервалом в еще 3 недели. При иммунизации через нос мыши находятся под эфирной анестезией. Для WSN контрольного вируса дикого типа (WT1, WT2) применяют ту же методику. Через 12 дней после конечной бустер-инъекции у мышей отбирают образцы крови, антисыворотку дезактивируют 1 ч при 56°C и определяют титры в ELISA и нейтрализующую активность антисыворотки.

На фиг. 3а показано связывание антисыворотки ELDKWAS-гриппа с пептидом, слитым с глутатион-трансферазой (GST) и содержащим у своего С-окончания последовательность ELDKWA. Последовательность определена с помощью ELISA. Титрационные микропланшеты на 96 лунок покрывают GST-ELDKWA слитым пептидом в количестве 4 мкг/мл (100 мкл/лунку) в карбонатном буфере (pH 9,6) и выдерживают 4 ч при комнатной температуре. Затем планшеты промывают ФБСР-0,05% Твина. Антисыворотку разбавляют ФБСР-1% БСА-0,05% Твина, вносят в планшеты и выдерживают 1 час при комнатной температуре. После промывания антитела обнаруживают инкубированием с козьим антимышиным IgG ( $\gamma$ -цепь) антителом, конъюгированным с пероксидазой хрена. Планшеты окрашивают применением в качестве субстрата дигидрохлорида о-фенилендиамина. Реакцию прекращают добавлением 2,5 М H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, и проводят измерение планшеты (длина волны 492 нм, ссылочная длина волны 620 нм).

На фиг. 3b воспроизведена методика, приведенная для фиг. 3а, за тем исключением, что для обнаружения антител применяют козье антимышиное IgA антитело, конъюгированное с пероксидазой хрена. Нейтрализующую активность антисыворотки определяют анализом с подавлением сицинтий. Эквивалентные разведения антисыворотки, при которых происходит подавление образования сицинтий на 50% (ЭД<sub>50</sub>), приведены в таблице. Антисыворотка от мышей M1-M3 нейтрализует испытуемую панель полностью при различных разбавлениях антисыворотки. Антисыворотка мышей M4 и M5 нейтрализует ВИЧ-1 изоляты MN и RF, но не IIB. Антисыворотка, индуцированная WSN вирусом дикого типа, не нейтрализует никаких испытанных ВИЧ-1 изолятов даже при самых низких разбавлениях сыворотки (1:20).

Для анализа с подавлением сицинтий

5 применяют индикаторную клеточную линию AA-2, описанную в работе: Chaffee и др., J. Exp. Med. (1988) 168, 605, и исходные замороженные образцы вирусного инокудума ВИЧ-1 штаммов MN, RF и IIB. Все образцы вируса разбавляют до концентрации  $9 \cdot 10^{-5} \cdot 10^2$  TCID<sub>50</sub> на мл. Мышиную антисыворотку разбавляют в 2 раза средой и вносят в традиционные микропланшеты на 96 лунок (4 повтора на каждое разбавление). К 50 мкл разбавленной антисыворотки добавляют 50 мкл вируса и смесь вирус - антитело выдерживают 2 ч при 4°C. Для инфицирования в каждую лунку вносят 100 мкл AA-2 клеток ( $5 \cdot 10^6$  клеток/мл); присутствие сицинтий регистрируют через 5 дней как указание на ВИЧ-1 инфекцию. Определение 50%-ой ингибирующей дозы (ЭД<sub>50</sub>) проводят по методике Reed и Muench, приведенной в Am. J. Hyg. (1938) 27, 493. Приведены эквивалентные разведения сыворотки, при которых происходит 50%-ое подавление образования сицинтий (ЭД<sub>50</sub>).

Пример 4. Экспрессии рекомбинантными бакуловирусами химерных гемагглютининов, несущих удлиненные 2F5-эпитопы.

Химерные гемагглютинины, содержащие шесть указанных пептидов, получают по методике примера 1. Последовательность, кодирующая эти химерные гемагглютинины, фланкирована сайтом фермента рестрикции BamHI и встроена в BamHI сайт плазмиды Bluebac III (Инвитроген, Сан-Диего, КА). Эксперименты с трансфекцией с целью получения рекомбинантных бакуловирусов, содержащих химерные гемагглютинины, проведены по методикам, приведенным в работах: Groebe и др., Nucleic. Acids Res. (1990) 18, 4033 и Felgner и др., Proc. Natl. Acad. Sci. США (1987) 84, 7413. Полученные рекомбинантные химерные бакуловирусы могут быть использованы для создания нейтрализующих ВИЧ-1 антител.

Пример 5. Иммунизация и реакции антител у мышей, иммунизированных клетками, инфицированными рекомбинантными бакуловирусами.

Применяемые для иммунизации Sf9 клетки инфицируют рекомбинантными бакуловирусами при множественности заражения (MOT) 1-5 и собирают через 3 дня после заражения. Клетки дважды промывают ФБСР и вновь суспендируют в ФБСР в концентрации  $5 \cdot 10^6$  клеток/мл. Данные клетки специфично реагируют с моноклональным антителом 2F5 в анализе вестерн блоттингом, что можно считать указанием на содержание в этих клетках гемагглютинина, несущего ELDKWAS или LEELDKWAS последовательность. Мышей линии Balb/cA иммунизируют четырьмя инъекциями внутрибрюшинно по  $1 \cdot 10^6$  инфицированных Sf9 клеток с интервалом в 2 недели (Van Wyke Coelingh и др. Virology (1987) 160, 4465). Через семь дней после четвертой иммунизации у мышей отбирают образцы крови и определяют ELISA титры антисыворотки. На фиг. 4 показано связывание созданной рекомбинантным бакуловирусом антисыворотки с синтетическим пептидом, состоящим из последовательности Gly Gly Gly Glu Leu Asp Lys Trp Ala (GGGELDKWA) методом ELISA, осуществленным по методике примера 2.

Индукция секреторных антител.

Иммунизация, проведенная введением по меньшей мере одного, предпочтительно смеси шести указанных пептидов, привела к значительному улучшению IgG ELDKWA-специфических ELISA титров. Более того, в отличие от иммунизации с применением ELDKWA последовательности иммунизация шестью указанными пептидами приводит также к значительной IgA реакции. Оказалось неожиданно то, что такая IgA иммунная реакция запускается также и на уровне слизистой.

Пример 6. IgA антитела в секрете дыхательных путей Balb/c мышей, иммунизированных вирусом гриппа-ELDKWAS.

Мышей иммунизируют введением через нос  $10^2$  PFU и спустя 4 недели повторно иммунизируют введением тем же путем  $10^5$  PFU. Третью иммунизацию проводят спустя еще 4 недели введением через нос (IN) или интратрахеально (IP)  $10^7$  PFU. Через 8 недель после третьей иммунизации собирают и объединяют продукты промывания носа и методом ELISA определяют реакционность этих образцов с пептидом ELDKWA. В качестве контроля (образец WT) анализируют объединенные продукты промывания носов мышей, иммунизированных вирусом гриппа дикого типа (WT). Применена та же схема иммунизации, что и для IN группы (см. фиг. 5). Индуцированные антитела продуцируются преимущественно слизистой носа, и можно считать, что титр антитела необычайно высок. Из фиг. 5 видно также, что введение через нос вируса гриппа-ELDKWAS приводит к более высокой концентрации ВИЧ-1 нейтрализующих антител по сравнению с интратрахеальным введением.

Пример 7. TgA антитела в секрете кишечника Balb/c мышей, иммунизированных вирусом гриппа-ELDKWAS.

Мышей иммунизируют введением через нос  $10^2$  PFU и спустя 4 недели повторно иммунизируют введением тем же путем  $10^6$  PFU. Третью иммунизацию проводят спустя еще 4 недели введением через нос (см. фиг. 6a) или интратрахеально (см. фиг. 6b)  $10^7$  PFU. Через 8 недель после третьей иммунизации собирают и экстрагируют фекалии, содержащие антитела, выделенные из слизистой кишечника и методом ELISA определяют реакционность этих образцов относительно пептида ELDKWA. INO, INR, INB и INS - это образцы от мышей, которым третья иммунизация проводилась через нос, а образцы IPO, IPR, IPRS и IPS отобраны у мышей, которым третья иммунизация проводилась интратрахеально.

WT1 и WT2 - это образцы контрольных мышей, иммунизированных вирусом гриппа дикого типа (WT).

### Формула изобретения:

1. Пептид, способствующий образованию антител, проявляющих нейтрализующую активность в отношении различных штаммов и/или клинических изолятов ВИЧ-1 и/или подавляющих слияние клеток ВИЧ-1, отличающийся тем, что пептид состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из ELDKWA, LELDKWA, ELDNWA, ELNKWA, LELDNWA и LELNKWA.

2. Пептид, связанный с носителем, содействующий формированию антител, проявляющих нейтрализующую активность по отношению к различным штаммам и/или клиническим изолятам ВИЧ-1 и/или подавляющих слияние ВИЧ-1 клеток, отличающийся тем, что пептид состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из ELDKWA, LELDKWA, ELDNWA, LELDNWA, ELNKWA, LELNKWA, и связан с носителем, которым является вирус или вирусный белок.

3. Пептид по п. 2, отличающийся тем, что носителем является предпочтительно рекомбинантный вирус, выбранный из группы, состоящей из вируса гриппа, бакуловируса и вируса коровьей оспы или вирусного белка, выбранного из группы, состоящей из гемагглютинаина (HA) вируса гриппа, нейраминидазы (NA) вируса гриппа и поверхностного антигена вируса гепатита В.

4. Пептид по п. 2 или 3, отличающийся тем, что, по меньшей мере, одна из аминокислотных последовательностей, описанных в п. 1, заменяет, по крайней мере, часть аминокислотной последовательности вирусного белка или встроена, по крайней мере, в один антигенный участок вирусного белка.

5. Пептид по п. 2, отличающийся тем, что пептид связан с вирусным белком, подвергаемым воздействию клетки, необязательно S<sub>9</sub> клетки, предварительно инфицированной вирусом, содержащим упомянутый пептид, связанный с упомянутым вирусным белком.

6. Фармацевтическое средство, способствующее образованию антител, которые проявляют нейтрализующую активность в отношении различных штаммов и/или клинических изолятов ВИЧ-1 и/или подавляют слияние ВИЧ-1 клеток, отличающееся тем, что включает, по меньшей мере, один пептид, выбранный из группы, состоящей из ELDKWA, LELDKWA, ELDNWA, ELNKWA, LELDNWA и LELNKWA, и/или, по крайней мере, один из упомянутых пептидов, связанных с носителем, который является вирусом, предпочтительно выбранным из группы, состоящей из вируса гриппа, бакуловируса и вируса коровьей оспы, или же является частью вируса, предпочтительно вирусного протеина, выбранного из группы, состоящей из гемагглютинаина (HA) вируса гриппа, нейраминидазы (NA) вируса гриппа и поверхностного антигена вируса гепатита В.

7. Фармацевтическое средство по п. 6, отличающееся тем, что индуцирует секрецию анти-ВИЧ-1 IgA антител, предпочтительно поверхностью слизистой оболочки млекопитающего.

8. Фармацевтическое средство по п. 6 или 7 для профилактики ВИЧ-1 инфекции у индивидуумов из группы риска.

9. Способ для производства пептида, связанного с носителем, способствующего формированию антител, проявляющих нейтрализующую активность в отношении различных штаммов и/или клинических изолятов ВИЧ-1 и/или подавляющих слияние ВИЧ-1 клеток, который включает приготовление нуклеотидной последовательности, соответствующей



аминокислотной последовательности пептида, связанного с вирусным белком, где пептид выбирается из группы, состоящей из ELDKWAS, LELDKWAS, ELDNWAS, ELNKWAS, LELDNWAS и LELNKWAS, с переносом упомянутой нуклеотидной последовательности в организм хозяина для получения химерного вируса, осуществляя экспрессию в подходящих условиях и выделяя пептиды, связанные с носителем в виде упомянутого химерного вируса.

10. Способ по п. 9, где упомянутый пептид заменяет, по меньшей мере, часть аминокислотной последовательности вирусного белка или встраивается в антигенный участок вирусного белка.

11. Способ по п. 9 или 10, где вирусный белок выбирают из группы, состоящей из гемагглютинаина вируса гриппа, нейраминидазы вируса гриппа и поверхностного антигена вируса гепатита В.

12. Способ по пп. 9, 10 или 11, где вирус группы, состоящей из предпочтительно рекомбинантного вируса гриппа, бакуловируса и вируса коровьей оспы, используется в качестве организма-хозяина.

13. Способ для производства антитела, проявляющего ВИЧ-1 нейтрализующую активность и способного предотвращать слияние ВИЧ-1 клеток, отличающийся тем, что пептид, выбранный из группы, состоящей из ELDKWAS, LELDKWAS, ELDNWAS, ELNKWAS, LELDNWAS и LELNKWAS, вводят в иммунную систему человека или животного,

причем пептид предпочтительно связан с носителем, который является вирусом, предпочтительно выбираемым из группы, состоящей из вируса гриппа, бакуловируса и вируса коровьей оспы, или же частью вируса, предпочтительно вирусного белка, выбранного из группы, состоящей из гемагглютинаина (HA) вируса гриппа, нейраминидазы (NA) вируса гриппа и поверхностного антигена вируса гепатита В, с продуцированием в результате названного антитела.

14. Способ по п. 13, отличающийся тем, что упомянутый пептид вводят в иммунную систему через поверхность слизистой оболочки, предпочтительно через нос.

15. Способ по п. 13 или 14, отличающийся тем, что антитело получают путем секреции поверхностью слизистой оболочки.

16. Способ по п. 13, отличающийся тем, что для пептидов, связанных с носителем, применяют вирус, предпочтительно вирус гриппа, или часть вируса, предпочтительно гемагглютинин вируса гриппа, в качестве носителя.

17. Антитело, проявляющее ВИЧ-1 нейтрализующую активность и способное предотвратить слияние ВИЧ-1 клеток, характеризующееся следующими свойствами: относится к типу I<sub>g</sub>A; направлено на эпитоп ELDKWA; получают способом согласно п. 13; секретируется преимущественно поверхностью слизистой оболочки.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

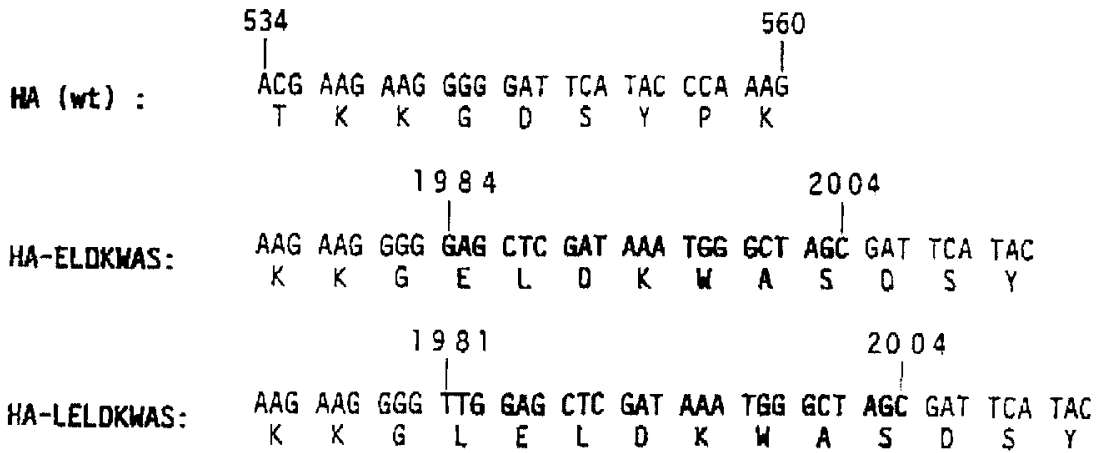
55

60

НЕЙТРАЛИЗАЦИЯ ВИЧ-1 СЫВОРОТКОЙ, ИНДУЦИРОВАННОЙ ПРОТИВ ХИ-  
 МЕРНОГО ВИРУСА ГРИППА

Титр нейтрализации ( $ЭД_{50}$ )

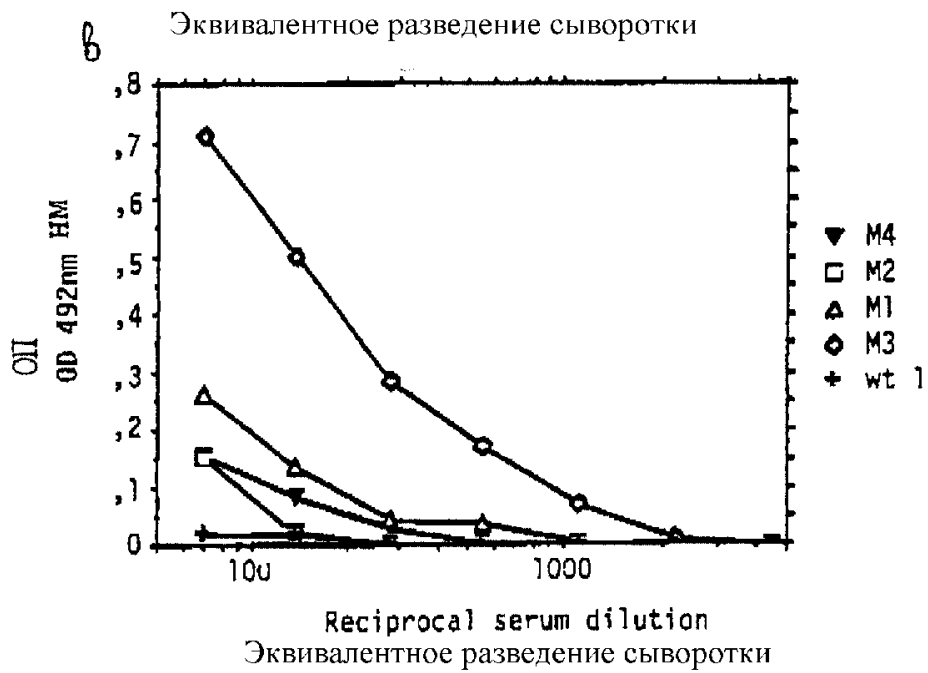
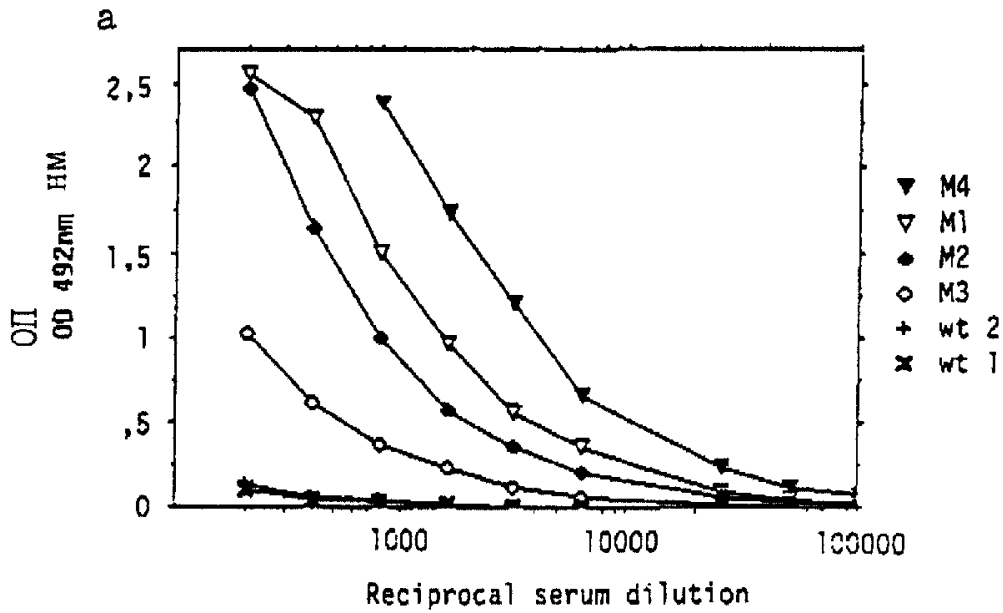
антисыворотка	MII	PT	III B
M1	53	95	20
M2	24	40	160
M3	34	160	67
M4	29	24	НЕ ИСПЫТЫВАЛАСЬ
M5	20	34	24



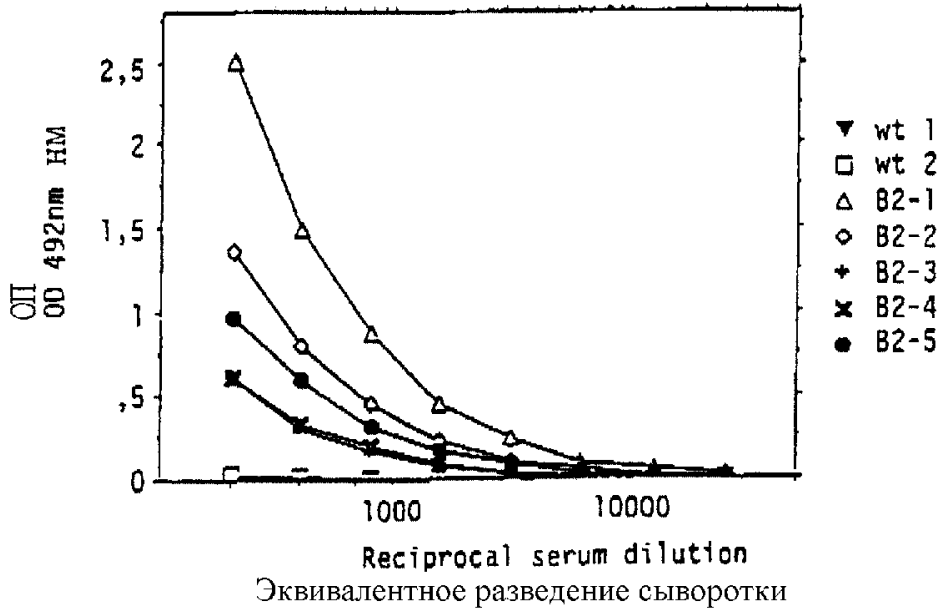
Фиг.2

RU 2181379 C2

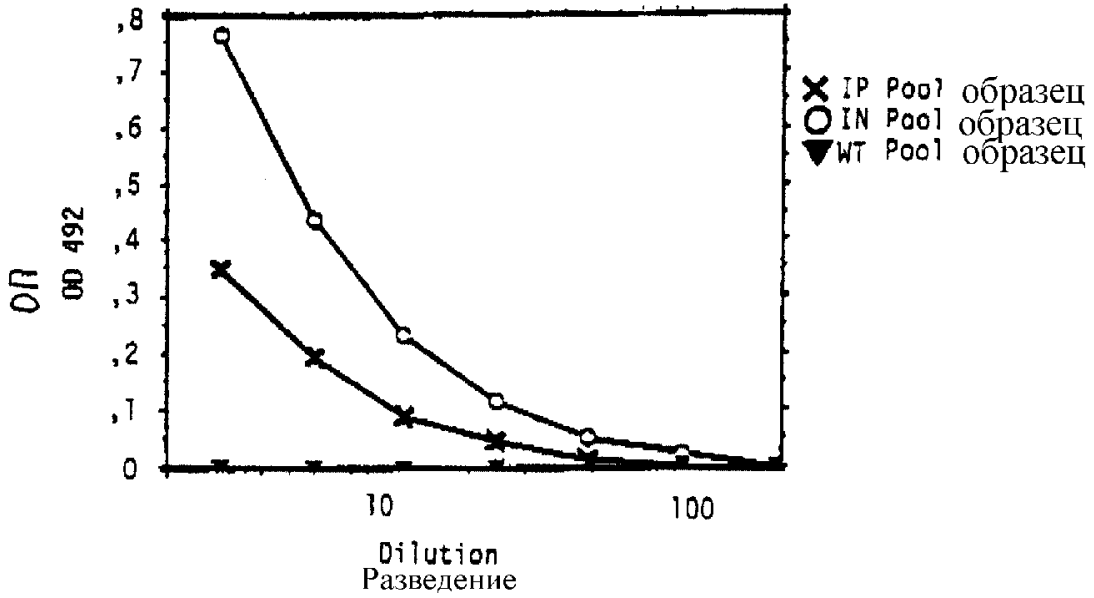
RU 2181379 C2



Фиг.3



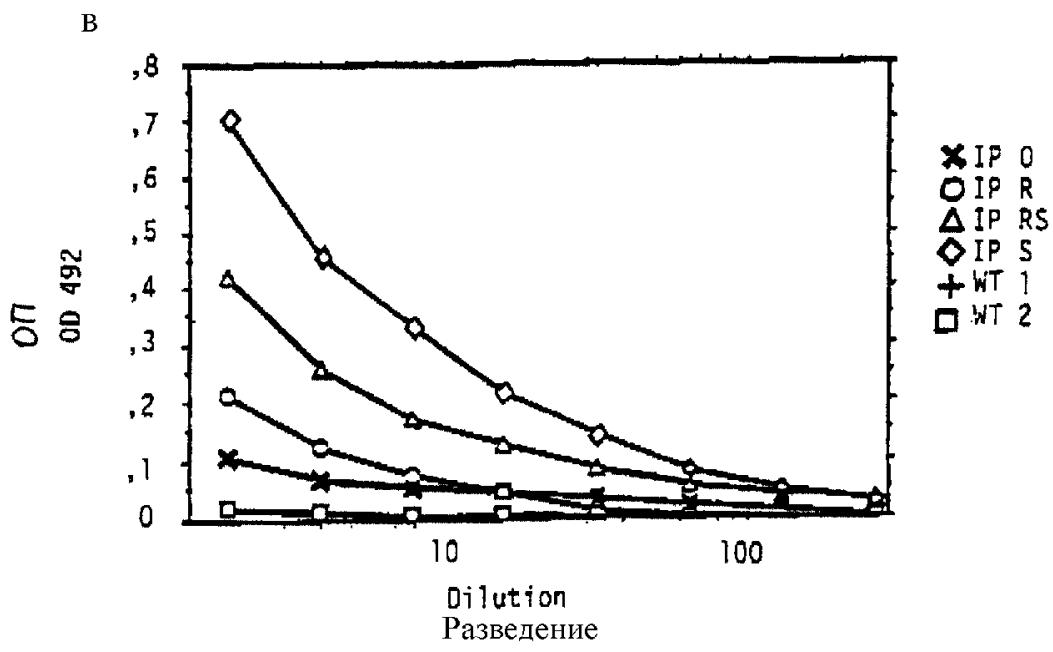
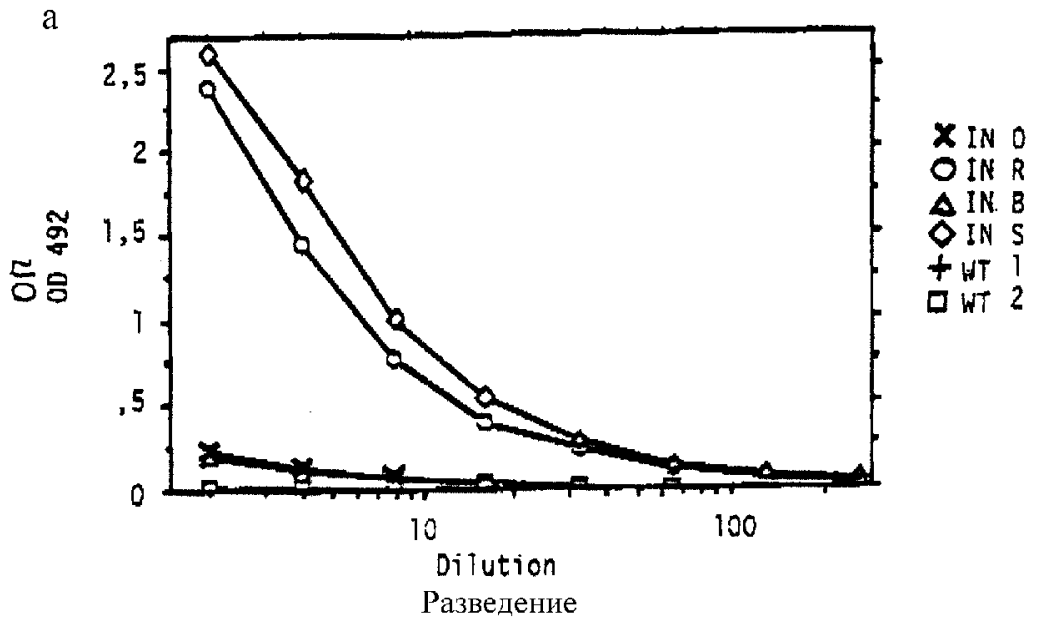
Фиг.4



Фиг.5

RU 2181379 C2

RU 2181379 C2



Фиг.6