

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **018201**

(13) **B1**

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

(45) Дата публикации и выдачи патента
2013.06.28

(51) Int. Cl. *A61K 39/00* (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)

(21) Номер заявки
200901434

(22) Дата подачи заявки
2008.05.22

(54) **ЛИОФИЛИЗИРОВАННАЯ АНТИГЕННАЯ КОМПОЗИЦИЯ**

(31) **РСТ/EP2007/055037; 0723044.4;
0723900.7**

(56) EP-A1-1547581
US-A-7049302
US-A-6949520

(32) **2007.05.24; 2007.11.23; 2007.12.06**

(33) **EP; GB; GB**

(43) **2010.06.30**

(86) **РСТ/EP2008/056305**

(87) **WO 2008/142133 2008.11.27**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ГЛАКСОСМИТКЛАЙН
БАЙОЛОДЖИКАЛС С.А. (BE)**

(72) Изобретатель:
Лемуан Доминик Ингрид (BE)

(74) Представитель:
Поликарпов А.В., Борисова Е.Н. (RU)

(57) В настоящем изобретении предложены лиофилизированные композиции, содержащие антиген и агонист Толл-подобного рецептора (TLR) 9. Такие композиции можно разводить носителем, выбранным из группы носителей в форме частиц, состоящей из липосом, минеральных солей, эмульсий, полимеров и иммуностимулирующих комплексов (ISCOM), с получением иммуногенных композиций для применения в вакцинации. Здесь также предложены способы изготовления иммуногенных композиций из лиофилизированных композиций по изобретению и их применение в иммунизации.

B1

018201

018201

B1

Область техники

Настоящее изобретение относится к усовершенствованным антигенным композициям и способам их использования для изготовления иммуногенных композиций. В частности, настоящее изобретение относится к лиофилизированным композициям, содержащим антиген и агонист Toll-подобного рецептора (TLR) 9. Такие композиции можно разводить носителем, выбранным из группы носителей в форме частиц, состоящей из липосом, минеральных солей, эмульсий, полимеров и иммуностимулирующих комплексов (ISCOM), с получением иммуногенных композиций для применения в вакцинации. Способы изготовления иммуногенных композиций из лиофилизированных композиций по изобретению и их применение в иммунизации также составляют часть настоящего изобретения.

Предшествующий уровень техники

Адьюванты иногда используют для улучшения иммунного ответа, вызванного на любой данный антиген. Однако включение адьювантов в вакцину или иммуногенную композицию увеличивает как сложность приготовления компонентов, так и сложность распределения и включения в препарат вакцинной композиции. Приготовление каждого из адьювантных компонентов, а также антигенного компонента должно быть учтено разработчиками. Это особенно верно, поскольку, например, значение pH адьювантных компонентов может сильно отличаться от оптимального значения pH для данного антигена, и эти отличия необходимо тщательно контролировать и уметь предотвратить, например осаждение или потерю желаемых свойств компонентов. Значение pH антигена в воде для инъекций может, например, составлять примерно pH 7 или несколько выше, и при добавлении адьюванта pH может быть столь низким, как pH 6,3. Антиген может, например, не быть стабильным при хранении в течение длительных периодов при таком значении pH.

Затем компоненты должны быть включены в препарат и распределены в форме, которая является настолько стабильной, насколько возможно, поскольку фармацевтические препараты для применения людьми должны быть хорошо охарактеризованы, стабильны и безопасны, прежде чем они могут быть одобрены для продажи. В связи с этим на конечном препарате должны быть проведены исследования долговременной стабильности, чтобы гарантировать, что он удовлетворяет соответствующим критериям. Информацию, полученную в таких длительных исследованиях, используют для подтверждения представления в нормативно-правовые органы, такие как FDA (Федеральное управление по лекарственным средствам - орган, ответственный за одобрение лекарственных средств в США), чтобы показать, что препарат пригоден для применения людьми.

Сублимационную сушку или лиофилизацию используют, как правило, для повышения стабильности и, следовательно, срока хранения вещества, включая фармацевтические вещества, такие как антиген, применяемый в вакцинах.

Часто лиофилизированные антигенные композиции предлагаются специалистам в области здравоохранения для разведения разбавителем (например, водой для инъекций [WFI] или в некоторых случаях жидким адьювантным препаратом) непосредственно перед введением пациенту. В таком случае период времени, в течение которого различные компоненты конечной вакцины поддерживаются в тесном контакте, сводят к минимуму.

Многие факторы должны быть учтены, когда антигены лиофилизируют с образованием лиофилизированных осадков (сухого продукта в результате лиофилизации). Например, антигенность/иммуногенность антигена должна сохраняться в лиофилизированной форме. Антиген не должен образовывать агрегаты или распадаться, когда он находится в лиофилизированной форме. Лيوфилизированный осадок должен быть хорошо сформирован и не должен спадаться. Наконец, антиген должен, конечно, находиться в форме, которая быстро растворяется при разведении. Когда раствор для разведения не представляет собой просто WFI, например, когда антиген разводят жидким адьювантом, тогда необходимо учитывать влияние компонентов этого раствора на свойства разведенного продукта.

Как упомянуто, адьюванты применяли в течение многих лет для улучшения иммунного ответа на антигенный компонент вакцины. Особенно сильной адьювантной комбинацией является такая, которая содержит 3-деацелированный монофосфориллипид A (3D-MPL) и сапонин, в частности QS21, где очищенная фракция сапонина экстрагирована из коры *Quillaja saponaria* Molina. Данная комбинация может быть представлена, например, в виде эмульсии масло-в-воде, препарата липосом или т.п.

В предшествующих клинических испытаниях с антигенами, например с малярийными антигенами, такими как RTS,S, предложен лиофилизированный антиген, а также предложен отдельный флакон жидкого адьюванта, например препарата масло-в-воде MPL и QS21 или препарата липосом MPL и QS21, для разведения антигена. Индивидуальные компоненты объединяют с образованием конечной вакцинной композиции непосредственно перед введением.

Некоторые иммуностимулирующие олигонуклеотиды, содержащие неметилованные CpG-динуклеотиды ("CpG"), являются лигандами TLR9 и идентифицированы как являющиеся адьювантами при введении как системным путем, так и путем введения в слизистую оболочку (WO 96/02555, EP 468520, Davis et al., J. Immunol., 1998, 160 (2):870-876; McCluskie and Davis, J. Immunol., 1998, 161 (9):4463-6). CpG представляет собой аббревиатуру для цитозин-гуанозин-динуклеотидных мотивов, присутствующих в ДНК. Исторически наблюдали, что ДНК-фракция вакцины БЦЖ (BCG) может проявлять

противоопухолевый эффект. При дальнейших исследованиях было показано, что синтетические олигонуклеотиды, имеющие происхождение от последовательностей гена BCG, способны индуцировать иммуностимулирующие эффекты (как *in vitro*, так и *in vivo*). Авторы этих исследований пришли к выводу, что некоторые палиндромные последовательности, включая центральный CG-мотив, являются носителями данной активности. Центральная роль CG-мотива в иммуностимуляции была объяснена позже в публикации Krieg, Nature 374, p. 546, 1995. Подробный анализ показал, что CG-мотив должен находиться в окружении определенной последовательности и что такие последовательности распространены в бактериальной ДНК, но редки в ДНК позвоночных. Иммуностимулирующая последовательность часто представляет собой пурин, пурин, С, G, пиримидин, пиримидин; где динуклеотидный CG-мотив не метилирован, но известно, что другие неметилированные CpG-последовательности являются иммуностимулирующими, и их можно применять в настоящем изобретении.

Также показано, что иммуностимулирующий олигонуклеотид может сохранять иммунологическую активность, когда гуанозин мутирован до 7-деазагуанозинового мотива (WO 03057822).

Считают, что эти иммуностимулирующие олигонуклеотиды имеют кислый рН в растворе, например ниже рН 7, такой как 6,3, 6,1 или ниже. Это может затруднить их включение в жидкие вакцинные препараты, поскольку они не имеют сходства с другими компонентами препарата. Как обсуждалось, это может вызвать осаждение и/или проблемы долговременной стабильности.

Считают, что эти иммуностимулирующие олигонуклеотиды, вероятно, являются очень эффективными адъювантами, в частности, при использовании в комбинации с существующими адъювантными комбинациями, такими как 3D-MPL и QS21. Ожидают, что такие адъюванты применимы при заболеваниях, для которых до сих пор было трудно получить эффективные вакцины, таких как вирус иммунодефицита человека (ВИЧ), рак и, возможно, малярия.

Существует ряд различных путей, при которых адъюванты могут быть включены в вакцины, но они должны быть включены таким путем, который не влияет на стабильность ни их самих, ни антигенной композиции, а также таким путем, который не создаст ненужную нагрузку специалистам в области здравоохранения, разводящим вакцину. Простейшим путем для достижения этого должно быть помещение дополнительных компонентов в дополнительные флаконы, так чтобы держать их отдельно до момента непосредственного разведения, сводя, таким образом, к минимуму время, в течение которого компоненты могут влиять друг на друга. Это означает, что антиген и иммуностимулирующий олигонуклеотид каждый должен быть предложен в отдельном флаконе. Затем, если используют дополнительные адъювантные компоненты, такие как MPL и QS21, они могут быть представлены в виде жидкой смеси в третьем флаконе. Однако возрастающее число компонентов при возрастающем числе флаконов приводит к повышенным затратам, отходам и, что важно, к возрастанию возможности ошибок во время разведения.

Краткое изложение сущности изобретения

Авторы настоящего изобретения обнаружили, что, когда лиганд TLR9, такой как иммуностимулирующий олигонуклеотид CpG, составляет часть иммуногенной композиции в качестве адъюванта, указанный лиганд TLR9 может быть лиофилизирован вместе с антигеном, так что предложен один флакон, содержащий антиген и лиганд TLR9 в качестве адъюванта вместе в виде одного лиофилизированного осадка.

Таким образом, в настоящем изобретении предложена лиофилизированная композиция, содержащая антиген и агонист TLR9. Указанный агонист TLR9 в одном воплощении представляет собой иммуностимулирующий олигонуклеотид, возможно CpG-содержащий олигонуклеотид. В одном аспекте указанный CpG-содержащий олигонуклеотид включает последовательность пурин, пурин, С, G, пиримидин, пиримидин. В другом аспекте указанный иммуностимулирующий олигонуклеотид выбран из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1; SEQ ID NO: 2; SEQ ID NO: 3; SEQ ID NO: 4 и SEQ ID NO: 5.

Не желая быть связанными с теорией, считают, что предоставление антигена и агониста TLR9 вместе дает компонент, который является более стабильным, чем просто добавление TLR9 к жидкому препарату MPL и QS21.

Настоящее изобретение обеспечивает преимущество в том, что, когда антиген и агонист TLR9 разводят WFI, есть возможность предложения только одного флакона с лиофилизированным препаратом в нем. Кроме того, когда антиген и агонист TLR9 должен быть разведен жидким препаратом, таким как жидкий адъювантный препарат, преимущество состоит в возможности предложения только двух флаконов компонентов (а не трех). Это, в свою очередь, экономически эффективно, обеспечивая при этом препарат, подходящий для применения однократно разведенной вакцины.

Кроме того, авторы настоящего изобретения обнаружили, что совместная лиофилизация CpG с антигенами, которые не будут иметь общий положительный заряд в буфере для разведения, может повысить растворимость этих антигенов при разведении либо водой для инъекций, либо жидким адъювантом. Таким образом, в настоящем изобретении также предложен способ повышения растворимости лиофилизированного антигена при разведении, где антиген не будет иметь суммарный положительный заряд в буфере для разведения, включающий стадию совместной лиофилизации агониста TLR9, предпочтительно иммуностимулирующего олигонуклеотида и более предпочтительно CpG-олигонуклеотида, с антигеном. В настоящем изобретении также предложено применение агониста TLR9, предпочтительно имму-

ностимулирующего олигонуклеотида и более предпочтительно CpG-олигонуклеотида, для повышения растворимости лиофилизированного, не имеющего положительного заряда антигена при разведении. Под "не имеющим положительного заряда" подразумевают, что общий заряд белка не является положительным. Белок может содержать как положительные, так и отрицательные заряды, но общий заряд белка является либо нейтральным, либо отрицательным.

В настоящем изобретении также предложен способ изготовления иммуногенной композиции, включающий стадии разведения лиофилизированной композиции, как описано здесь, подходящим носителем. В одном воплощении указанный носитель представляет собой раствор липосом или эмульсию масло-в-воде. Указанный носитель возможно может содержать один или более чем один иммуностимулятор, который может быть выбран из группы, состоящей из агонистов TLR4, антагонистов TLR4, сапонинов, агонистов TLR7, агонистов TLR8, агонистов TLR9. В одном воплощении указанный носитель содержит два или более чем два иммуностимулятора, и в одном аспекте они могут представлять собой 3-деацелированный MPL и QS21.

В настоящем изобретении также предложен способ изготовления лиофилизированной композиции по изобретению, включающий объединение одного или более чем одного желательного антигена, лиганда TLR9 и подходящих эксципиентов и сублимационную сушку полученной смеси.

Подробное описание изобретения

Авторы настоящего изобретения обнаружили, что лиганды TLR9, такие как CpG-олигонуклеотиды, могут быть лиофилизированы с интересующим антигеном, не оказывая влияние на антигенность или стабильность этого антигена. Под лигандом TLR9 подразумевают соединение, которое взаимодействует с рецептором TLR9.

Показано, что члены семейства Toll-подобных рецепторов (TLR), впервые открытых у дрозофилы, являются образраспознающими рецепторами, где каждый представитель распознает и отвечает на различные компоненты микроорганизмов, чтобы ограничить/ликвидировать инвазивные микроорганизмы. Связывание ассоциированных с патогенами характерных участков молекулы (PAMP) с TLR индуцирует продуцирование реакционноспособных промежуточных соединений кислорода и азота, инициацию сети провоспалительных цитокинов и позитивную регуляцию костимулирующих молекул, связывая быстрый характерный ответ с адаптивным иммунитетом. Известно, что многие лиганды TLR полезны в качестве адъювантов. Показано, что TLR9 отвечает на олигонуклеотидные агонисты. Следовательно, лиганды TLR9 по изобретению являются иммуностимулирующими олигонуклеотидами. В одном воплощении изобретения такие лиганды TLR9 содержат CpG-мотив. Альтернативные иммуностимулирующие олигонуклеотиды могут содержать модификации нуклеотидов. Например, в WO 0226757 и WO 03057822 раскрыты модификации С- и G-части CpG-содержащих иммуностимулирующих олигонуклеотидов.

В одном воплощении лиганды TLR9 представляют собой CpG-олигонуклеотиды. В одном аспекте данного воплощения CpG-олигонуклеотид содержит два или более чем два динуклеотидных CpG-мотива, разделенных по меньшей мере тремя, возможно по меньшей мере шестью или более нуклеотидами. Олигонуклеотиды по настоящему изобретению обычно представляют собой дезоксинуклеотиды. В одном воплощении межнуклеотидная связь в олигонуклеотиде представляет собой фосфородитионатную или, возможно, фосфоротионатную связь, хотя фосфодиэфирные и другие межнуклеотидные связи также могут быть использованы, включая олигонуклеотиды со смешанными межнуклеотидными связями. Способы получения фосфоротионатных или фосфородитионатных олигонуклеотидов описаны в US 5666153, US 5278302 и WO 95/26204. Рассмотрен олигонуклеотид, содержащий различные межнуклеотидные связи, например смешанные фосфоротионатные фосфодиэфиры. Могут быть использованы другие межнуклеотидные связи, которые стабилизируют олигонуклеотид.

Примеры CpG-олигонуклеотидов имеют приведенные ниже последовательности. В одном воплощении эти последовательности содержат модифицированные фосфоротионатом межнуклеотидные связи.

OLIGO 1 (SEQ ID NO: 1): TCC ATG ACG TTC CTG ACG TT (CpG 1826).

OLIGO 2 (SEQ ID NO: 2): TCT CCC AGC GTG CGC CAT (CpG 1758).

OLIGO 3 (SEQ ID NO: 3): ACC GAT GAC GTC GCC GGT GAC GGC ACC ACG.

OLIGO 4 (SEQ ID NO: 4): TCG TCG TTT TGT CGT TTT GTC GTT (CpG 2006).

OLIGO 5 (SEQ ID NO: 5): TCC ATG ACG TTC CTG ATG CT (CpG 1668).

Альтернативные CpG-олигонуклеотиды могут содержать приведенные выше последовательности, в которых они имеют несущественные делеции или добавления к ним.

CpG-олигонуклеотиды, используемые в настоящем изобретении, могут быть синтезированы любым способом, известным в данной области техники (например, EP 468520). Для удобства такие олигонуклеотиды могут быть синтезированы с использованием автоматизированного синтезатора.

В контексте настоящего описания термин "антиген" предназначен для обозначения иммуногенного компонента, подходящего для индуцирования специфического иммунного ответа и подходящего для включения в вакцину или иммуногенную композицию, например антиген для включения в вакцину против ВИЧ-1, вакцину против рака, малярийную вакцину, ТВ-вакцину или т.п. Подробности о специфических антигенах приведены ниже.

В одном воплощении антиген имеет изоэлектрическую точку 9,6 или менее. В одном воплощении

антиген имеет изоэлектрическую точку 9 или менее. В одном воплощении антиген имеет изоэлектрическую точку 8,5 или менее. В одном воплощении антиген имеет изоэлектрическую точку 8,0 или менее. В одном воплощении антиген имеет изоэлектрическую точку 7,5. В одном воплощении антиген имеет изоэлектрическую точку в интервале от 7 до 8.

Суммарный заряд белка при разведении в буфере зависит от количества положительных зарядов против количества отрицательных зарядов в белке, где этот заряд, конечно, будет варьировать в зависимости от pH буфера для разведения. Изоэлектрическая точка представляет собой значение pH, при котором суммарный заряд белка является нейтральным. Если pH буфера для разведения ниже изоэлектрической точки антигена, белок склонен нести суммарный положительный заряд. Если pH буфера для разведения выше изоэлектрической точки антигена, белок склонен нести суммарный отрицательный заряд. Настоящее изобретение особенно полезно при лиофилизации и разведении антигенов, которые имеют такую изоэлектрическую точку, что в предназначенном буфере для разведения белок будет нести суммарный отрицательный заряд. При таких условиях (см. пример 3) присутствие CpG в лиофилизированной композиции может усилить растворимость антигена в буфере для разведения.

В одном воплощении лиофилизированный антиген и агонист TLR9 представлены в виде одной дозы, например в одном флаконе.

В одном воплощении лиофилизированный антиген присутствует в количестве, которое обеспечивает концентрацию антигена в интервале от 10 до 250 мкг при разведении.

В одном воплощении агонист TLR9 присутствует в количестве, которое обеспечивает концентрацию в интервале от 10 до 1000 мкг, как, например, 500 мкг, при разведении.

В одном воплощении изобретения антиген, который объединяют в лиофилизированной композиции с лигандом TLR9, может представлять собой противоопухолевый антиген. Следовательно, иммуногенные композиции, изготовленные с использованием лиофилизированной антигенной композиции по изобретению, полезны для иммунотерапевтического лечения злокачественных новообразований. Например, лиофилизированная композиция может быть изготовлена с раковыми антигенами, опухолевыми антигенами или антигенами отторжения опухоли, как описано здесь, такими как белки, экспрессирующиеся, среди прочего, при раке простаты, раке молочной железы, раке прямой и ободочной кишки, раке легкого, раке почки, раке яичника, раке печени и раке головы и шеи.

Антигены рака семенников, которые могут быть использованы в настоящем изобретении, включают семейство антигенов MAGE A: MAGE-A1, A2, A3, A4, A5, A6, A7, A8, A9, A10, A11 и A12, также известных как MAGE-1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12; антигенов MAGE B: MAGE B1, B2, B3 и B4; антигенов MAGE C: MAGE-C1 и MAGE-C2; антиген LAGE 1; антиген LAGE 2 (также известный как NY-ESO-1) и антиген GAGE.

Простатоспецифические антигены могут также быть использованы в настоящем изобретении. Примеры простатоспецифических антигенов, которые могут быть гибридными, включают шести-трансмембранный эпителиальный антиген простаты (STEAP), простатоспецифический антиген (PSA), простатическую кислую фосфатазу (PAP), простатический антиген стволовых клеток (PSCA), простатоспецифический мембранный антиген (PSMA) или антиген, известный как простаза (также известный как P703P).

В одном воплощении простатический антиген представляет собой P501S или его фрагмент. P501S, также называемый простейин, представляет собой белок из 553 аминокислот. Иммуногенные фрагменты и участки P501S, содержащие по меньшей мере 20, 50 или 100 непрерывных аминокислот, или фрагменты, содержащие между 20-50 или 50-100 непрерывных аминокислот, могут быть использованы в качестве опухолеассоциированного антигена или производного по настоящему изобретению. В одном воплощении опухолеассоциированный антиген или производное представляет собой антиген PS108 (раскрытый в WO98/50567) или белок, ассоциированный с раком простаты (см. WO 99/67384). В некоторых воплощениях фрагменты представляют собой аминокислоты 51-553, 34-553 или 55-553 полноразмерного белка P501S. Они могут экспрессироваться в дрожжевых системах, например, последовательности ДНК, кодирующие такие полипептиды, могут экспрессироваться в дрожжевых системах.

В одном воплощении антиген может включать WT-1, экспрессируемый геном опухоли Вильмса, или его N-концевой фрагмент WT-1F, содержащий примерно или приблизительно аминокислоты 1-249, либо состоять из них. WT1 представляет собой белок, сверхэкспрессия которого исходно обнаружена при раке почки у детей, опухоли Вильмса. Антиген, который может быть использован, включает почти полноразмерный белок в качестве антигена. В одном воплощении антиген может включать белок WT1-A10, который представляет собой рекомбинантный слитый белок из 292 аминокислот, состоящий из 12-мерной укороченной последовательности tat и аминокислот № 2-281 последовательности WT1, или состоять из него.

В одном воплощении изобретения опухолеассоциированный антиген или производное представляет собой антиген рака молочной железы, например Her-2/neu, мамаглобин или антиген B305D.

Антиген Her-2/neu для применения в настоящем изобретении может содержать полноразмерный внеклеточный домен (ECD; например, последовательность, содержащую приблизительно аминокислоты 1-645 аминокислотной последовательности Her-2/neu) или его фрагменты. Альтернативно или дополни-

тельно, конструкция может содержать по меньшей мере иммуногенный участок полноразмерного внутриклеточного домена: например, приблизительно 580 С-концевых аминокислот последовательности Her-2/neu.

Одна из конструкций, которая может быть использована в качестве производного опухолеассоциированного антигена по настоящему изобретению, представляет собой слитый белок из ECD и домена фосфорилирования (PD) Her-2/neu (ECD-PD). Еще одна конструкция, которая может быть использована, представляет собой слитый белок из ECD и фрагмента домена фосфорилирования Her-2/neu (ECD-APD). Слитые белки и конструкции Her-2/neu, которые описаны, могут иметь происхождение от Her-2/neu человека, крысы, мыши или обезьяны/мартышки. Примерные последовательности и конструкции Her-2/neu описаны в WO 00/44899.

PRAME (также известный как DAGE) представляет собой другой антиген, который может быть использован в качестве опухолеассоциированного антигена по настоящему изобретению. Также могут быть использованы слитые белки, как описано здесь, которые содержат антиген PRAME. В частности, слияния антигена PRAME, как описано здесь, и белка D в качестве партнера слияния белка или производного, как описано здесь, рассмотрены для применения в настоящем изобретении.

Несколькими группами показано, что антиген PRAME экспрессируется при меланоме и широком ряде опухолей, включая рак легкого, почки и головы и шеи. Интересно, что также оказалось, что он экспрессируется при 40-60% лейкозов, таких как острый лимфоидный лейкоз и острый миелоидный лейкоз, см., например, *Exp Hematol.* 2000 Dec; 28 (12): 1413-22. У пациентов наблюдали, что сверхэкспрессия PRAME, как оказалось, ассоциирована с более высокой выживаемостью и более низкими частотами рецидивов по сравнению с теми, у которых нет сверхэкспрессии этого белка.

Антиген и его препарат описаны в патенте США № 5830753. PRAME находится в Аннотированной базе данных генов человека H-Inv DB под номерами по каталогу: U65011.1, BC022008.1, AK129783.1, BC014974.2, CR608334.1, AF025440.1, CR591755.1, BC039731.1, CR623010.1, CR611321.1, CR618501.1, CR604772.1, CR456549.1 и CR620272.1.

В одном аспекте антиген по настоящему изобретению может включать антиген PRAME или его иммуногенный фрагмент, либо состоять из него. Как правило, белок PRAME имеет 509 аминокислот, и в одном воплощении все 509 аминокислот PRAME могут быть включены в антиген.

Колоректальные антигены могут также быть использованы в качестве опухолеассоциированных антигенов по настоящему изобретению. Примеры колоректальных антигенов, которые могут быть использованы, включают: C1585P (MMP 11) и C1491 (белок, связывающий энхансер E1A), CASB618 (как описано в WO 00/53748); CASB7439 (как описано в WO 01/62778) и C1584 (Cripto).

Другие опухолеассоциированные антигены, полезные в контексте настоящего изобретения, включают: Plu-1, *J. Biol. Chem.* 274 (22), 15633-15645, 1999, HASH-1, HASH-2, Cripto (Salomon et al. *Bioessays* 199, 21 61-70, патент США 5654140), Criptin, патент США 5981215. Кроме того, антигены, особенно релевантные для вакцин при терапии рака, также включают тирозиназу и сурвивин.

Пептиды, имеющие происхождение от муцина, такие как Muc1, см., например, US 5744144, US 5827666, WO 8805054, US 4963484. Конкретно рассмотрены пептиды, имеющие происхождение от Muc1, которые содержат по меньшей мере одну повторяющуюся единицу пептида Muc1, предпочтительно по меньшей мере два таких повтора, и которые распознаются антителом SM3 (US 6054438). Другие пептиды, имеющие происхождение от муцина, включают пептид из Muc5.

Другие опухолеспецифические антигены подходят для применения в лиофилизированной композиции по настоящему изобретению и включают, но не ограничены ими, опухолеспецифические ганглиозиды, такие как GM2 и GM3, или их конъюгаты с белками-носителями; либо указанный антиген может представлять собой аутологичный пептидный гормон, такой как полноразмерный рилизинг-фактор гормона гонадотропина (GnRH, WO 95/20600), короткий пептид длиной 10 аминокислот, полезный в лечении многих видов рака или при иммунокастрации.

Изобретение также распространяется на применение вышеописанных антигенов, иммуногенных производных и иммуногенных фрагментов, а также слитых белков, содержащих их, в аспектах настоящего изобретения.

Производные, фрагменты и слитые белки

Опухолеассоциированные антигены по настоящему изобретению могут быть использованы в форме их производных или фрагментов, а не встречающегося в природе антигена.

Термин "производное", как он использован здесь, относится к антигену, который модифицирован относительно его встречающейся в природе формы. Производное может включать мутацию, например точечную мутацию. В одном примере производное может изменять свойства белка, например, благодаря улучшению экспрессии в прокариотических системах или благодаря удалению нежелательной активности, например ферментативной активности. Производные по настоящему изобретению в достаточной степени подобны нативным антигенам в сохранении антигенных свойств и сохранении способности обеспечивать иммунный ответ, который должен быть вызван против природного антигена. Вызывает ли данное производное такой иммунный ответ, можно измерить с помощью подходящего иммунологического анализа, такого как твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA) или проточная цитометрия.

В одном воплощении настоящего изобретения производное опухолеассоциированного антигена по настоящему изобретению представляет собой слитый белок, содержащий опухолеассоциированный антиген, связанный с гетерологичным белком-партнером слияния. Под термином "гетерологичный" в отношении опухолеассоциированного антигена подразумевают белок или полипептидную последовательность, которые не будут связываться с опухолеассоциированным антигеном в природе, т.е. они связываются с опухолеассоциированным антигеном в результате намеренного вмешательства человека.

Антиген и гетерологичный белок-партнер слияния могут быть конъюгированы химическим путем либо могут экспрессироваться в виде рекомбинантных слитых белков. В одном воплощении слитый белок по настоящему изобретению может обеспечить получение повышенных уровней слитого белка, продуцируемого в экспрессионной системе, по сравнению с неслитым белком. Таким образом, белок-партнер слияния может способствовать обеспечению Т-хелперных эпитопов, например Т-хелперных эпитопов, распознаваемых человеком (т.е. белок-партнер слияния действует как иммунологический партнер слияния). Партнер слияния может способствовать экспрессии белка при более высоких выходах, чем нативного рекомбинантного белка (т.е. белок-партнер слияния действует как усилитель экспрессии). В одном воплощении белок-партнер слияния может действовать и как иммунологический партнер слияния, и как партнер, усиливающий экспрессию.

Белки-партнеры слияния могут иметь происхождение, например, от белка D. Белок D представляет собой липопротейн (белок 42 кДа, связывающий иммуноглобулин D, экспонированный на поверхности грамотрицательной бактерии *Haemophilus influenzae*). Этот белок синтезируется в виде предшественника с сигнальной последовательностью из 18 аминокислотных остатков, содержащей консенсус-последовательность для бактериального липопротейна (см. WO 91/18926). Нативный белок-предшественник белка D подвергается процессингу во время секреции, и сигнальная последовательность отщепляется. Цистеин (Cys) процессированного белка D (в положении 19 в молекуле предшественника) становится N-концевым остатком процессированного белка и параллельно модифицируется путем ковалентного присоединения жирных кислот, как связанных сложноэфирной связью, так и связанных амидной связью. Жирные кислоты, связанные с аминоконцевым остатком цистеина, затем функционируют в качестве мембранного якоря.

В одном воплощении производное опухолеассоциированного антигена для применения в настоящем изобретении может включать белок D или его производное в качестве белка-партнера слияния.

Белок D или его производное, как описано здесь, может содержать, например, первую или N-концевую треть процессированного белка D или приблизительно или примерно первую или N-концевую треть процессированного белка D. В одном воплощении белок D или его производное может включать первые или N-концевые 100-115 аминокислот процессированного белка D; либо первые или N-концевые 109 аминокислот процессированного белка D. В одном воплощении аминокислоты 2-Lys и 3-Leu нативного процессированного белка D могут быть заменены аминокислотами 2-Asp и 3-Pro.

В одном воплощении белок D или его производное может дополнительно включать 18- или 19-аминокислотную сигнальную последовательность белка-предшественника D. В одном воплощении белок-партнер слияния, происходящий из белка D, содержит аминокислоты 20-127 белка-предшественника D или состоит из них. В одном воплощении настоящего изобретения две аминокислоты 21-Lys и 22-Leu белка-предшественника D, который является белком-партнером слияния, могут быть заменены аминокислотами 21-Asp и 22-Pro.

Белок-партнер слияния, представляющий собой белок D, как описано здесь, может дополнительно или альтернативно содержать делеции, замены или вставки в пределах аминокислотной последовательности по сравнению с предшественником дикого типа или процессированной последовательностью белка D. В одном воплощении 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или более аминокислот могут быть вставлены, заменены или делетированы. Аминокислоты могут быть заменены консервативными заменами, как определено здесь, либо могут быть использованы другие аминокислоты.

В одном воплощении белок-партнер слияния может содержать последовательность белка D, как показано в SEQ ID NO: 1, или состоять из нее. В одном воплощении белок-партнер слияния может содержать аминокислоты, подчеркнутые на фиг. 1, т.е. аминокислотные остатки 20-127 включительно из SEQ ID NO: 12, или состоять из них. В одном воплощении антиген для применения в настоящем изобретении может представлять собой белок-D-MAGE-3, в котором антиген MAGE-3 состоит из аминокислот 3-314 MAGE-3, и в котором белок-партнер слияния, представляющий собой белок D, состоит из аминокислотной последовательности, показанной на фиг. 1.

В другом воплощении настоящего изобретения белки-партнеры слияния могут быть выбраны из NS1 или LysA, либо их производных, как описано ниже.

NS1 представляет собой неструктурный белок из вируса гриппа. В одном воплощении производное опухолеассоциированного антигена по настоящему изобретению может включать NS1 или его производное в качестве белка-партнера слияния. NS1 или его производное может содержать его N-концевые аминокислоты 1-81.

LysA выделен из *Streptococcus pneumoniae*. C-концевой домен белка LysA ответственен за сродство к холину или к некоторым аналогам холина, таким как DEAE. В одном воплощении производное опухо-

леассоциированного антигена по настоящему изобретению может включать LysA или его производное в качестве белка-партнера слияния. LysA или его производное может включать повторяющийся участок молекулы LysA, находящийся на С-конце, начиная с остатка 178. В одном воплощении LysA или его производное содержит остатки 188-305 С-LysA.

Иммуногенные полипептиды для применения в настоящем изобретении обычно представляют собой рекомбинантные белки, продуцируемые, например, путем экспрессии в гетерологичном хозяине, таком как бактериальный хозяин, в дрожжах или культивируемых клетках млекопитающих.

Термин "производное опухолеассоциированного антигена" означает полипептид, который частично или полностью содержит последовательности, которые встречаются в природе в опухолеассоциированном антигене или которые обладают высокой степенью идентичности последовательности с ними (например, более чем 95% идентичности последовательности на отрезке по меньшей мере из 10 аминокислот, например по меньшей мере 20 аминокислот). Производные также включают последовательности, имеющие консервативные замены. Консервативные замены хорошо известны и в общем представлены в виде матриц замен по умолчанию в компьютерных программах выравнивания последовательностей.

В общем смысле замены в пределах приведенных ниже групп представляют собой консервативные замены, а замены между приведенными ниже группами считают неконсервативными. Эти группы представляют собой:

- 1) аспаргат/аспарагин/глутамат/глутамин;
- 2) серин/треонин;
- 3) лизин/аргинин;
- 4) фенилаланин/тирозин/триптофан;
- 5) лейцин/изолейцин/валин/метионин;
- 6) глицин/аланин.

Производные по настоящему изобретению могут также включать химически обработанные последовательности, такие как обработанные альдегидом (таким как формальдегид или глутаральдегид), карбоксиметилированием, карбоксиамидированием, ацилированием и другими рутинными химическими обработками. Конструкции по настоящему изобретению, имеющие дериватизированные остатки свободного тиола, могут быть также использованы в настоящем изобретении. В частности, могут быть использованы карбоксиамидированные или карбоксиметилированные тиоловые производные.

В одном воплощении настоящего изобретения производное опухолеассоциированного антигена может представлять собой антиген MAGE, как описано здесь, имеющий дериватизированные остатки свободного тиола. Эти дериватизированные остатки свободного тиола могут представлять собой карбоксимидные или карбоксиметилированные производные.

Производное опухолеассоциированного антигена по настоящему изобретению может альтернативно включать конструкцию, содержащую более чем один опухолеассоциированный антиген. В одном воплощении настоящего изобретения производное опухолеассоциированного антигена может включать два или более чем два опухолеассоциированных антигена.

Термин "фрагмент", как он использован здесь, относится к фрагментам опухолеассоциированного антигена или производного этого антигена, которые содержат по меньшей мере один эпитоп, например CTL эпитоп, как правило, пептид по меньшей мере из 8 аминокислот. Фрагменты по меньшей мере из 8, например 8-10 аминокислот или вплоть до 20, 50, 60, 70, 100, 150 или 200 аминокислот в длину считают включенными в объем изобретения настолько, насколько этот фрагмент проявляет антигенность, т.е. основные эпитопы (например CTL эпитопы) сохранены этим фрагментом, и этот фрагмент способен к индукции иммунного ответа, который перекрестно реагирует с природным опухолеассоциированным антигеном. Примерные фрагменты могут составлять 8-10, 10-20, 20-50, 50-60, 60-70, 70-100, 100-150, 150-200 аминокислотных остатков в длину (включая любое значение в этих интервалах).

В одном воплощении изобретения лиофилизированную композицию, содержащую антиген Her 2 пеп и CpG-олигонуклеотид, разводят носителем, представляющим собой эмульсию липосом или масло-в-воде, содержащую 3D-MPL и QS21. Такие разведенные препараты продуцируют как гуморальный, так и клеточно-опосредованный иммунный ответ.

Леофилизированные композиции по изобретению могут содержать антигены, ассоциированные с механизмами поддержания опухоли (например, ангиогенезом, опухолевой инвазией), например, tie 2, VEGF (фактор роста эндотелия сосудов).

В другом аспекте изобретения антиген в лиофилизированной композиции по изобретению представляет собой антиген, выбранный из антигенов, происходящих из ВИЧ, в частности антигенов, происходящих из ВИЧ-1. В приведенных ниже абзацах описаны антигены, которые могут иметь происхождение из ВИЧ-1.

Белки Tat и Nef ВИЧ представляют собой ранние белки, т.е. они экспрессируются на ранней стадии инфекции и в отсутствие структурного белка.

Ген Nef кодирует ранний вспомогательный белок ВИЧ, который, как показано, обладает несколькими активностями. Например, известно, что белок Nef вызывает удаление CD4, рецептора ВИЧ, с клеточной поверхности, хотя биологическое значение этой функции является спорным. Кроме того, Nef

взаимодействует с биохимическим путем передачи сигнала Т-клетками и индуцирует активное состояние, которое, в свою очередь, может стимулировать более эффективную экспрессию гена. Некоторые изоляты ВИЧ имеют мутации или делеции в этой области, в результате которых они не кодируют функциональный белок, и их репликация и патогенез *in vivo* сильно нарушены.

Ген Gag транслируется с полноразмерной РНК с образованием полипротеина-предшественника, который впоследствии расщепляется на 3-5 капсидных белков; матриксный белок p17, капсидный белок p24 и белок, связывающий нуклеиновую кислоту (Fundamental Virology, Fields BN, Knipe DM and Howley M, 1996, 2. Fields Virology, vol. 2, 1996).

Ген Gag образует белок-предшественник Gag, 55 килодальтон (кД), также называемый p55, который экспрессируется с несплайсированной вирусной мРНК. В процессе трансляции N-конец p55 подвергается миристоиллированию, запускающему его связывание с цитоплазматической стороной клеточных мембран. Связанный с мембраной полипротеин Gag рекрутирует две копии вирусной геномной РНК наряду с другими вирусными и клеточными белками, которые запускают активную репликацию вирусной частицы в результате проникновения в клетку с поверхности инфицированной клетки. После этой активной репликации p55 расщепляется протеазой, кодируемой вирусом (продуктом гена Pol), в процессе созревания вируса в четыре белка меньшего размера, обозначенные MA (матриксный[p17]), CA (капсидный[p24]), NC (нуклеокапсидный [p9]) и p6.

В дополнение к 3 основным белкам Gag (p17, p24 и p9) все предшественники Gag содержат несколько других областей, которые отщепляются и остаются в вирионе в виде пептидов различных размеров. Эти белки играют различные роли, например белок p2 играет предполагаемую роль в регуляции активности протеазы и вносит вклад в правильный тайминг протеолитического процессинга.

Полипептид MA происходит из N-концевого миристоилированного конца p55. Большинство молекул MA остается присоединенным к внутренней поверхности липидного бислоя вириона, стабилизируя частицу. Подгруппа MA рекрутируется внутрь более глубоких слоев вириона, где она становится частью комплекса, который сопровождает вирусную ДНК в ядро. Эти молекулы MA способствуют ядерному транспорту вирусного генома, поскольку сигнал ядерной локализации на MA распознается клеточным механизмом ядерного транспорта. Этот феномен дает возможность ВИЧ инфицировать неделящиеся клетки, что является необычным свойством для ретровируса.

Белок p24 (CA) образует конический кор вирусной частицы. Продемонстрировано, что циклофилин А взаимодействует с областью p24 p55, что приводит к его включению в частицы ВИЧ. Взаимодействие между Gag и циклофилином А существенно, поскольку прерывание этого взаимодействия циклоспорином ингибирует вирусную репликацию.

Область NC Gag ответственна за специфичное распознавание так называемого сигнала упаковки ВИЧ. Сигнал упаковки состоит из четырех структур типа "стебель-петля", локализованных вблизи 5'-конца вирусной РНК, и достаточен для того, чтобы опосредовать включение гетерологичной РНК в вирионы ВИЧ-1. NC связывается с сигналом упаковки посредством взаимодействий, опосредованных двумя мотивами типа "цинковые пальцы". NC также способствует обратной транскрипции.

Область полипептида p6 опосредует взаимодействия между p55 Gag и вспомогательным белком Vpr, приводя к включению Vpr в собирающиеся вирионы. Область p6 также содержит так называемый поздний домен, который требуется для эффективного высвобождения активно реплицирующихся вирионов из инфицированной клетки.

Ген Pol кодирует три белка, обладающих активностями, необходимыми вирусу на ранней стадии инфекции, обратную транскриптазу RT, протеазу и белок интегразу, необходимый для интеграции вирусной ДНК в клеточную ДНК. Первичный продукт Pol расщепляется протеазой вириона с образованием аминоконцевого пептида RT, который содержит активности, необходимые для синтеза ДНК (РНК- и ДНК-направленную ДНК полимеразу, рибонуклеазу H), и карбокси-концевого белка интегразы. RT ВИЧ представляет собой гетеродимер полноразмерной RT (p66) и продукта расщепления (p51), у которого отсутствует карбокси-концевой домен РНКазы H.

RT представляет собой один из наиболее высоко консервативных белков, кодируемых ретровирусным геномом. Двумя основными активностями RT являются ДНК Pol и рибонуклеаза H. ДНК Pol активность RT использует ДНК и РНК в качестве матриц взаимозаменяемо и, подобно всем известным ДНК-полимеразам, неспособна инициировать синтез ДНК *de novo*, а требует уже существующей молекулы, которая служит в качестве праймера (РНК).

Активность РНКазы H, присущая всем белкам RT, при ранней репликации играет незаменимую роль по удалению РНК-генома в процессе синтеза ДНК. Она селективно разрушает РНК из всех гибридных молекул РНК-ДНК. Структурно полимеразы и РНКазы H занимают отдельные, неперекрывающиеся домены в пределах Pol, охватывающие две трети с аминоконца Pol.

Каталитическая субъединица p66 уложена в 5 отдельных субдоменов. Аминоконцевые 23 аминокислоты из них имеют участок с активностью RT. Карбокси-концевые аминокислоты от них представляют собой домен РНКазы H.

После инфицирования клетки-хозяина ретровирусный РНК-геном копируется в линейную двунитевую ДНК обратной транскриптазой, которая присутствует в инфицирующей частице. Интегразы (обзор

сделан Skalka AM '99 Adv in Virus Res 52, 271-273) распознает концы вирусной ДНК, обрезает их и сопровождает вирусную ДНК к сайту хромосомы хозяина для катализа интеграции. Многие сайты в ДНК хозяина могут быть мишенями интеграции. Хотя интегразы достаточны для катализа интеграции *in vitro*, она является не единственным белком, связанным с ДНК *in vivo*; большой комплекс белок-вирусная ДНК, выделенный из инфицированных клеток, обозначен как прединтеграционный комплекс. Это способствует приобретению генов клетки-хозяина потомством вирусных геномов.

Интегразы состоят из 3 отдельных доменов: N-концевого домена, каталитического кода и C-концевого домена. Каталитический коровый домен содержит все необходимое для химии полинуклеотидного переноса.

Антигены, происходящие из ВИЧ-1, для применения в изобретении могут быть, таким образом, выбраны, например, из Gag (например, полноразмерного Gag), p17 (участка Gag), p24 (другого участка Gag), p41, p40, Pol (например, полноразмерного Pol), RT (участка Pol), p51 (участка RT), интегразы (участка Pol), протеазы (участка Pol), Env, gp120, gp140 или gp160, gp41, Nef, Vif, Vpr, Vpu, Rev, Tat, а также их иммуногенных производных и их иммуногенных фрагментов, в частности, Env, Gag, Nef и Pol и их иммуногенных производных и их иммуногенных фрагментов, включая p17, p24, RT и интегразу. ВИЧ-вакцины могут содержать полипептиды и/или полинуклеотиды, кодирующие полипептиды, соответствующие множественным различным антигенам ВИЧ, например, 2 или 3 либо 4 или более антигенов ВИЧ, которые могут быть выбраны из приведенного выше перечня. Несколько различных антигенов могут, например, быть включены в единый слитый белок. Более чем один первый иммуногенный полипептид и/или более чем один второй иммуногенный полипептид, каждый из которых представляет собой антиген ВИЧ, либо слияние более чем одного антигена могут быть использованы.

Например, антиген может включать Gag или его иммуногенное производное или иммуногенный фрагмент, слитый с RT или его иммуногенным производным или иммуногенным фрагментом, слитым с Nef или его иммуногенным производным или иммуногенным фрагментом, где участок Gag слитого белка присутствует на 5'-конце полипептида.

Последовательность Gag, применяемая в соответствии с изобретением, может исключать последовательность, кодирующую полипептид p6 Gag. Конкретный пример последовательности Gag для применения в изобретении включает кодирующие последовательности p17 и/или p24.

Последовательность RT может содержать мутацию, для того чтобы, по существу, инактивировать какую-либо активность обратной транскриптазы (см. WO 03/025003).

Ген RT представляет собой компонент гена *pol* большего размера в геноме ВИЧ. Следует понимать, что последовательность RT, применяемая в соответствии с изобретением, может присутствовать в контексте Pol или фрагмента Pol, соответствующего по меньшей мере RT. Такие фрагменты Pol сохраняют основные CTL эпитопы Pol. В одном конкретном примере RT включает по меньшей мере только фрагмент p51 или только фрагмент p66 RT.

Компонент RT слитого белка или композиции согласно изобретению возможно содержит мутацию для удаления сайта, который служит в качестве внутреннего сайта инициации в прокариотических экспрессионных системах.

Возможно последовательность Nef для применения в изобретении укорочена для удаления последовательности, кодирующей N-концевую область, т.е. удаления от 30 до 85 аминокислот, например от 60 до 85 аминокислот, в частности N-концевых 65 аминокислот (на последнее укорочение здесь ссылаются как на trNef). Альтернативно или дополнительно, Nef может быть модифицирована для удаления сайта миристоилирования. Например, сайт миристоилирования Gly 2 может быть удален путем делеции или замены. Альтернативно или дополнительно, Nef может быть модифицирована для изменения дилейцинового мотива Leu 174 и Leu 175 путем делеции или замены одного или обоих лейцинов. Важность дилейцинового мотива в негативной регуляции CD4 описана, например, в Bresnahan P.A. et al. (1998), *Current Biology*, 8 (22): 1235-8.

Антиген Env может присутствовать в его полноразмерном виде как gp160, либо в укороченном виде как gp140 или короче (возможно с подходящей мутацией для разрушения мотива сайта расщепления между gp120 и gp41). Антиген Env может также присутствовать в его встречающейся в природе процессированной форме в виде gp120 и gp41. Эти два производных gp160 могут быть использованы индивидуально или вместе в виде комбинации. Вышеупомянутые антигены Env могут дополнительно проявлять делеции (в частности, вариабельных петель) и укорочения. Фрагменты Env также могут быть использованы.

Примерная последовательность gp120 показана в SEQ ID NO: 6. Примерная последовательность gp140 показана в SEQ ID NO: 7.

Иммуногенные полипептиды для применения в лиофилизированной композиции согласно изобретению могут включать Gag, Pol, Env и Nef, где присутствует по меньшей мере 75%, либо по меньшей мере 90%, либо по меньшей мере 95%, например 96%, CTL эпитопов этих нативных антигенов.

В лиофилизированных композициях, содержащих иммуногенные полипептиды, которые включают p17/p24 Gag, p66 RT и укороченный Nef, как определено выше, подходящим образом присутствует 96% CTL эпитопов нативных антигенов Gag, Pol и Nef.

В одном воплощении изобретения предложена лиофилизированная композиция, содержащая лиганд TLR9 и иммуногенный полипептид, содержащий p17, p24 Gag, p66 RT, укороченный Nef (без нуклеотидов, кодирующих концевые аминокислоты 1-85 - "trNef") в порядке Gag, RT, Nef.

Конкретные полинуклеотидные конструкции и соответствующие полипептидные антигены для применения в лиофилизированных композициях согласно изобретению включают:

- 1) p17, p24 (оптимизированный по кодонам)Gag - p66 RT (оптимизированный по кодонам) - укороченный Nef;
- 2) укороченный Nef - p66 RT (оптимизированный по кодонам) - p17, p24 (оптимизированный по кодонам) Gag;
- 3) укороченный Nef - p17, p24 (оптимизированный по кодонам) Gag - p66 RT (оптимизированный по кодонам);
- 4) p66 RT (оптимизированный по кодонам) - p17, p24 (оптимизированный по кодонам) Gag - укороченный Nef;
- 5) p66 RT (оптимизированный по кодонам) - укороченный Nef - p17, p24 (оптимизированный по кодонам) Gag;
- 6) p17, p24 (оптимизированный по кодонам) Gag - укороченный Nef - p66 RT (оптимизированный по кодонам).

Примерный слитый белок представляет собой слияние Gag, RT и Nef, в частности в порядке Gag-RT-Nef (см., например, SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO: 9). Другой примерный слитый белок представляет собой слияние p17, p24, RT и Nef, в частности в порядке p24-RT-Nef-p17. Этот слитый белок назван F4 и описан в WO 2006/013106. F4 является предпочтительным примером антигена ВИЧ, который может находиться в лиофилизированной композиции по изобретению. Нуклеотидная последовательность F4 приведена в SEQ ID NO: 10, где последовательность p24 выделена жирным шрифтом, последовательность Nef подчеркнута, а прямоугольники представляют собой нуклеотиды, введенные генетическим конструированием. Аминокислотная последовательность F4 приведена в SEQ ID NO: 11, где

последовательность P24: аминокислоты 1-232 (жирным шрифтом);

последовательность RT: аминокислоты 235-795;

последовательность Nef: аминокислоты 798-1002;

последовательность P17: аминокислоты 1005-1136;

прямоугольники: аминокислоты, введенные генетическим конструированием;

К (Лизин): вместо триптофана (W). Мутация введена для удаления активности фермента.

В другом воплощении лиофилизированная композиция содержит Gag, RT, интегразу и Nef, в частности в порядке Gag-RT-интегразы-Nef (см., например, SEQ ID NO: 11).

В других воплощениях антиген ВИЧ может представлять собой слитый полипептид, который содержит Nef, или его иммуногенное производное, или его иммуногенный фрагмент и p17 Gag и/или p24 Gag, или их иммуногенные производные, или их иммуногенные фрагменты, где, когда присутствуют оба p17 и p24 Gag, между ними находится по меньшей мере один ВИЧ или его иммуногенный фрагмент.

Например, Nef подходящим образом представляет собой полноразмерный Nef.

Например, p17 Gag и p24 Gag подходящим образом представляют собой полноразмерные p17 и p24, соответственно.

В одном воплощении лиофилизированная композиция содержит иммуногенный полипептид, включающий оба p17 и p24 Gag или их иммуногенные фрагменты. В такой конструкции компонент p24 Gag и компонент p17 Gag разделены по меньшей мере одним дополнительным антигеном ВИЧ или его иммуногенным фрагментом, таким как Nef и/или RT или их иммуногенные производные или их иммуногенные фрагменты. Дополнительные подробности см. в WO 2006/013106.

В слитых белках, которые содержат p24 и RT, может быть предпочтительным, чтобы p24 предшествовал RT в конструкции, поскольку, когда антигены экспрессируются отдельно в *E.coli*, наблюдают лучшую экспрессию p24, чем RT.

Некоторые конструкции для применения в лиофилизированных композициях согласно изобретению, включают приведенные ниже:

1. p24-RT-Nef-p17;
2. p24-RT*-Nef-p17;
3. p24-p51RT-Nef-p17;
4. p24-p51RT*-Nef-p17;
5. p17-p51RT-Nef;
6. p17-p51RT*-Nef;
7. Nef-p17;
8. Nef-p17 с линкером;
9. p17-Nef;
10. p17-Nef с линкером.

* представляет собой мутацию RT метионин₅₉₂ на лизин.

В другом аспекте в настоящем изобретении предложена лиофилизированная композиция, содержа-

шая слитый белок антигенов ВИЧ, содержащий по меньшей мере четыре антигена ВИЧ или их иммуногенных фрагмента, где эти четыре антигена или фрагмента представляют собой Nef, Pol и Gag или их производные. Предпочтительно Gag присутствует в виде двух отдельных компонентов, которые разделены по меньшей мере одним другим антигеном в слитом белке. Предпочтительно Nef представляет собой полноразмерный Nef. Предпочтительно Pol представляет собой р66 или р51RT. Предпочтительно Gag представляет собой р17 и р24 Gag. Другие предпочтительные признаки и свойства антигенных компонентов слитого белка в данном аспекте изобретения являются такими, как описано ниже.

Предпочтительными воплощениями данного аспекта являются четырехкомпонентные слияния, как уже перечислено выше.

1. р24-RT-Nef-р17;
2. р24-RT*-Nef-р17;
3. р24-р51RT-Nef-р17;
4. р24-р51RT*-Nef-р17.

Иммуногенные полипептиды, применяемые в лиофилизированной композиции по настоящему изобретению, могут иметь линкерные последовательности, присутствующие между последовательностями, соответствующими конкретным антигенам, таким как Gag, RT и Nef. Такие линкерные последовательности могут составлять, например, вплоть до 20 аминокислот в длину. В конкретном примере они могут составлять от 1 до 10 аминокислот или от 1 до 6 аминокислот, например 4-6 аминокислот.

Дополнительное описание таких подходящих антигенов ВИЧ можно найти в WO 03/025003.

Антигены ВИЧ для применения в настоящем изобретении могут иметь происхождение от любой филогенетической ветви ВИЧ, например филогенетической ветви А, филогенетической ветви В или филогенетической ветви С. Например, антигены ВИЧ могут иметь происхождение от филогенетической ветви А или В, в частности В.

В одном конкретном воплощении изобретения лиофилизированная композиция содержит более чем один иммуногенный полипептид. В одном аспекте данного воплощения первый иммуногенный полипептид представляет собой полипептид, включающий Gag и/или Pol и/или Nef или фрагмент или производное любого из них (например, р24-RT-Nef-р17). В одном конкретном аспекте данного воплощения изобретения второй иммуногенный полипептид представляет собой полипептид, включающий Gag и/или Pol и/или Nef или фрагмент или производное любого из них (например, Gag-RT-Nef или Gag-RT-интеграза-Nef).

Таким образом, в одном конкретном воплощении полипептид, включающий Gag и/или Pol и/или Nef или фрагмент или производное любого из них (например, р24-RT-Nef-р17), представляет собой первый иммуногенный полипептид, а полипептид, включающий Gag и/или Pol и/или Nef или фрагмент или производное любого из них (например, Gag-RT-Nef или Gag-RT-интеграза-Nef), представляет собой второй иммуногенный полипептид.

В другом конкретном воплощении изобретения первый иммуногенный полипептид представляет собой Env или его фрагмент или производное, например, gp120, gp140 или gp160 (в частности, gp120). В одном конкретном воплощении изобретения второй иммуногенный полипептид представляет собой полипептид, включающий Gag и/или Pol и/или Nef или фрагмент или производное любого из них (например, р24-RT-Nef-р17).

Таким образом, в одном конкретном воплощении Env или его фрагмент или производное, например gp120, gp140 или gp160 (в частности, gp120) представляет собой первый иммуногенный полипептид, а полипептид, включающий Gag и/или Pol и/или Nef или фрагмент или производное любого из них (например, р24-RT-Nef-р17), представляет собой второй иммуногенный полипептид.

В другом конкретном воплощении изобретения первый иммуногенный полипептид представляет собой полипептид, включающий Gag и/или Pol и/или Nef или фрагмент или производное любого из них (например, р24-RT-Nef-р17). В одном конкретном воплощении изобретения второй иммуногенный полипептид представляет собой Env или его фрагмент или производное, например gp120, gp140 или gp160 (в частности, gp120).

Таким образом, в одном конкретном воплощении полипептид, включающий Gag и/или Pol и/или Nef или фрагмент или производное любого из них (например, р24-RT-Nef-р17), представляет собой первый иммуногенный полипептид, а Env или его фрагмент или производное, например gp120, gp140 или gp160 (в частности, gp120), представляет собой второй иммуногенный полипептид.

Леофилизированная композиция может содержать один антиген или может содержать более чем один антиген.

В одном аспекте изобретения лиганд TLR9 используют для улучшения растворимости антигенов, которые не являются положительно заряженными. Авторы настоящего изобретения обнаружили, что, в частности, с антигенами, которые заряжены отрицательно, совместная лиофилизация Crg может улучшить их растворимость при разведении. Когда лиганд TLR9 является иммуностимулирующим олигонуклеотидом, антиген представляет собой молекулу с суммарным отрицательным зарядом. Когда этот лиганд лиофилизуют совместно с антигеном с суммарным положительным зарядом, существует возможность, что лиганд TLR9 будет взаимодействовать с антигеном при разведении лиофилизированной ком-

позиции, возможно, вызывая осаждение антигена. Это нежелательно, но специалист в данной области техники может избежать этого путем включения вместе с композицией для лиофилизации эксципиентов, которые известны как повышающие растворимость в таких ситуациях, такие как, например, L-аргинин.

Лиганд TLR9 и один или более чем один антиген объединяют с подходящими эксципиентами с образованием конечной массы препарата, который должен быть лиофилизирован. Оптимально эксципиенты будут содержать криозащитный агент для защиты белка от денатурации на ранних стадиях лиофилизации и защитный агент лиофилизации для предотвращения инактивации белка в процессе сушки. Могут быть использованы две различные молекулы, либо может быть использована одна молекула, которая обладает обоими свойствами, такая как дисахарид. Возможно, также можно добавлять кристаллический наполнитель, такой как маннит или глицин. Неионное поверхностно-активное вещество, такое как полисорбат или Tween®, может также быть добавлено, чтобы способствовать предотвращению агрегации белка. Эксципиенты могут также включать буферные соли для изменения pH конечной массы препарата.

Подходящие эксципиенты включают следующие: сахара, такие как сахароза, трегалоза, рафиноза, и мальтодекстрины, такие как мальтотриоза, мальтотетраоза, мальтопентаоза или мальтогексаоза; полиолы, такие как маннит или сорбит; полимеры, такие как декстран, полиэтиленгликоль (ПЭГ) или поливинилпирролидон (ПВП); аминокислоты, такие как глицин, аланин или аргинин.

Эксципиенты можно также объединять, так чтобы два или более чем два, например три или четыре эксципиента можно было использовать вместе. Возможные комбинации включают сахар и декстран, например сахарозу и декстран или трегалозу и декстран; сахар и ПЭГ, например ПЭГ 8000 и сахариды; сахар и ПВП, например сахарозу и ПВП; сахар и аминокислоты, например глицин и сахарозу; два сахара вместе, например сахарозу и глюкозу или сахарозу и рафинозу; сахарозу и полиолы, например сахарозу и сорбит или сахарозу и маннит; полиолы и аминокислоты, такие как маннит и глицин.

Поверхностно-активные вещества, такие как полисорбат или Tween®, могут быть добавлены к любой комбинации эксципиентов.

В целях образования иммуногенной композиции, которая может быть использована для вакцинации, лиофилизированную композицию, содержащую антиген и лиганд TLR9, разводят фармацевтически приемлемым разбавителем. Предпочтительный аспект изобретения состоит в том, что такой разбавитель должен представлять собой разбавитель в форме частиц, например раствор частиц соли металла или липосом, либо эмульсию масло-в-воде.

В одном воплощении разбавитель содержит дополнительные иммуностимуляторы. Это означает, что конечная разведенная иммуногенная композиция содержит другие иммуностимуляторы в дополнение к лиганду TLR9, находящемуся в лиофилизированной композиции.

Существует ряд известных иммуностимуляторов, которые известны как адъюванты либо отдельно, либо в комбинации. Врожденная или природная иммунная система распознает широкий спектр патогенов без необходимости в предварительном воздействии. Основные клетки, ответственные за врожденный иммунитет, моноциты/макрофаги и нейтрофилы, фагоцитируют патогены микроорганизмов и запускают врожденный, воспалительный и специфический иммунные ответы.

Липополисахариды (ЛПС) являются основной поверхностной молекулой внешней поверхности наружной мембраны грамотрицательных бактерий и встречаются исключительно в нем. Показано, что ЛПС являются лигандами TLR4. ЛПС затрудняют разрушение бактерий сывороточными комплементами и фагоцитарными клетками и вовлечены в адгезию для колонизации. ЛПС представляют собой группу структурно родственных комплексных молекул размером приблизительно 10000 Дальтон (Да) и состоят из трех ковалентно сшитых участков:

- (1) О-специфичная олигосахаридная цепь (О-антиген) в наружном участке;
- (2) коровый олигосахаридный центральный участок;
- (3) липид А - самый дальний внутренний участок, который служит в качестве гидрофобного якоря, он содержит дисахаридные звенья глюкозамина, которые несут длинноцепочечные жирные кислоты.

Показано, что биологические активности ЛПС, такие как летальная токсичность, пирогенность и адъювантные свойства, связаны с группировкой липида А. Напротив, иммуногенность ассоциирована с О-специфичным полисахаридным компонентом (О-антигеном). Давно известно, что как ЛПС, так и липид А обладают сильными адъювантными эффектами, но высокая токсичность этих молекул исключила их применение в вакцинных препаратах. Следовательно, предприняты значительные усилия в направлении снижения токсичности ЛПС и липида А при сохранении их адъювантных свойств.

Мутант *Salmonella minnesota R595* был выделен в 1966 году из культуры исходного (smooth) штамма (Luderitz et al. 1966, Ann. N. Y. Acad. Sci. 133: 349-374). Был проведен скрининг отобранных колоний на их чувствительность к лизису панелью фагов, и только те колонии, которые проявляли узкий диапазон чувствительности (чувствительные только к одному или двум фагам), были отобраны для дальнейшего исследования. Эти усилия привели к выделению мутантного штамма *deer tough*, который является дефектным по биосинтезу ЛПС, и он был назван *S. minnesota R595*.

По сравнению с другими ЛПС, продуцируемые мутантом *S. minnesota R595*, имеют относительно простую структуру.

(1) они не содержат O-специфичный участок - характерный признак, ответственный за сдвиг от фенотипа дикого типа smooth к мутантному фенотипу tough, и приводит в результате к потере вирулентности;

(2) коровый участок очень короткий - этот характерный признак повышает чувствительность штамма к ряду химических веществ;

(3) группировка липида А в высокой степени ацилирована жирными кислотами в количестве вплоть до 7.

4'-Монофосфориллипид А (MPL), который может быть получен кислотным гидролизом ЛПС, экстрагированного из мутантного штамма deer tough грамотрицательных бактерий, сохраняет адьювантные свойства ЛПС, демонстрируя при этом токсичность, которая снижена более чем в 1000 раз (как измерено на основании летальной дозы на эмбрионах куриных яиц) (Johnson et al., 1987, Rev. Infect. Dis. 9 Suppl: S512-S516). ЛПС обычно кипятят с обратным холодильником в растворах минеральных кислот средней силы (например, 0,1 М HCl) в течение периода приблизительно 30 мин. Этот процесс приводит в результате к дефосфорилированию в положении 1 и декарбогидрированию в положении 6' с получением MPL.

3-О-деацилированный монофосфориллипид А (3D-MPL), который может быть получен путем мягкого щелочного гидролиза MPL, обладает еще более сниженной токсичностью, при этом, опять же, сохраняя адьювантные свойства, см. US 4912094 (Ribi Immunochemicals). Щелочной гидролиз обычно проводят в органическом растворителе, таком как смесь хлороформ/метанол, путем насыщения водным раствором слабого основания, таким как 0,5 М карбонат натрия, при pH 10,5.

Дополнительная информация по получению 3D-MPL имеется, например, в US 4912094 и WO 02/078637 (Coriga Corporation).

Показано, что некоторые молекулы, которые не являются лигандами TLR, обладают адьювантной активностью. Сапонины килайи (Quillaja) представляют собой смесь тритерпеновых гликозидов, экстрагированных из коры дерева Quillaja saponaria. Неочищенные сапонины широко применяли в качестве ветеринарных адьювантов. Quil-A представляет собой частично очищенный водный экстракт вещества сапонинов килайи. QS21 представляет собой очищенную высокоэффективной жидкостной хроматографией (ВЭЖХ) нетоксичную фракцию Quil A, и этот способ ее получения (как QA21) раскрыт в патенте США № 5057540.

В одном аспекте изобретения разбавитель содержит один дополнительный иммуностимулятор. В другом аспекте изобретения разбавитель содержит более чем один дополнительный иммуностимулятор. Такие иммуностимуляторы могут представлять собой лиганды TLR4, сапонины, лиганды TLR7, лиганды TLR8 или лиганды TLR9. В одном воплощении изобретения дополнительный иммуностимулятор представляет собой лиганд TLR4, такой как 3D-MPL, как описано здесь. В еще одном воплощении изобретения дополнительный иммуностимулятор представляет собой QS21, как описано здесь. В еще одном воплощении изобретения разбавитель содержит QS21 и 3D-MPL. В одном аспекте данного воплощения разбавитель представляет собой эмульсию масло-в-воде, содержащую QS21 и 3D-MPL. В другом аспекте данного воплощения разбавитель представляет собой раствор липосом, содержащий QS21 и 3D-MPL.

Далее изобретение будет описано дополнительно со ссылкой на приведенные ниже не ограничивающие примеры.

Примеры

Пример 1. Сублимационная сушка CpG-олигонуклеотида и CPC-P501S в качестве антигена

Используемый антиген представлял собой CPC-P501S. Этот антиген показан на фиг. 1 в виде диаграммы, на которой часть, показывающая TM2-TM12, представляет собой антиген P501S; овальные формы на левой стороне представляют собой партнеры слияния CPC, а гистидиновый (His) хвост показан на правой стороне.

Антиген продуцировали, как показано, с His-хвостом в *S. cerevisiae*, а затем доводили до концентрации 700 мкг/мл, используя буфер Трис (5 мМ, pH 7,5) и Твин 80 (0,3%).

Для получения конечной массы препарата сахарозу (35%) добавляли в воду для инъекций до достижения конечной концентрации 6,3%. Затем добавляли Трис (1 М, pH 8,8), а затем Твин 80 (25%) до достижения конечной концентрации 0,2%. Эту смесь перемешивали магнитной мешалкой в течение 5 минут при комнатной температуре. Добавляли CPC-P501S и смесь перемешивали магнитной мешалкой в течение 4 минут при комнатной температуре. Затем добавляли CpG-олигонуклеотид с SEQ ID NO: 4 и полученную в результате смесь перемешивали магнитной мешалкой в течение 15 минут при комнатной температуре с получением конечной массы препарата. Композицию анализировали следующим образом:

	Конечная масса препарата (500 мкл)	Конечный контейнер (500 мкл) Доза для человека		Конечная масса препарата (500 мкл)	Конечный контейнер (500 мкл) Доза для человека
Осадки		После разведения 625 мкл AS01B	Осадки		После разведения 625 мкл AS01B
СРС-Р501	125 мкг	100 мкг	СРС-Р501	25 мкг	20 мкг
СрG	625 мкг	500 мкг	СрG	625 мкг	500 мкг
Трис	50 мМ	40 мМ	Трис	50 мМ	40 мМ
Твин 80	0,50 %	0,40 %	Твин 80	0,20%	0,16%
Сахароза	6,3%	5,0%	Сахароза	6,3%	5,0%
pH	9,1+/-0,1	7,4+/-0,1	pH	9,1+/-0,1	7,4+/-0,1

0,5 мл композиции заполняли в стеклянный флакон, который подвергали циклу лиофилизации, как показано на фиг. 2.

Характеристику осадка проводили путем визуального осмотра и измерения диаметра при T₀, через 1 неделю, 2 недели, 3 недели и 4 недели при 37°C на трех флаконах композиции (см. фиг. 3). Остаточное содержание влаги измеряли в те же моменты времени и при той же температуре, используя термогравиметрический анализ (ТГ) или анализ по Карлу Фишеру (КФ). Как видно ниже, осадки были стабильны в течение времени вплоть до 2 недель.

Лиофилизированный осадок.

Стабильность во времени	Визуальный аспект	Диаметр осадка (мм)	Содержание влаги (масс.% H ₂ O/масса осадка)	
			КФ	ТГ
T ₀	ОК	12,6±0,1	0,3% (1,5 месяца при 4°C)	0,8% (5 месяцев при 4°C)
1 неделя 37°C	ОК	нд	0,59%	нд
2 неделя 37°C	Ретракция +	9,8±0,8	нд	1,4%
3 недели 37°C	Ретракция ++	7,7±1,0	нд	1,2%
4 недели 37°C	Ретракция ++	8,7±1,5	неизмеримо	1,3%

КФ: метод Карла Фишера.

ТГ: Термогравиметрический метод.

нд: не делали.

ОК: нет ни агрегации, ни разрушения.

Спецификация: 3% (термогравиметрический метод).

Влажность в конечном контейнере, который хранят при 37°C (для ускорения анализа на стабильность), возрастает со временем. Через 1 месяц при 37°C осадки содержат 1,3% H₂O и подвергаются ретракции. В данном эксперименте возрастание влажности является следствием того факта, что гигроскопичный порошок абсорбирует воду из пробок. Замена пробок новыми типами пробок может способствовать предотвращению такой ретракции.

Затем осадки разводили либо водой для инъекций, либо следующими жидкими носителями: адьювантная система А (липосомный адьювант, приготовленный, как описано в WO 2005/112991), адьювантная система Е (адьювант в виде эмульсии масло-в-воде, приготовленный, как описано в WO 2005/112991) или адьювантная система F (адьювант в виде эмульсии масло-в-воде, приготовленный, как описано в WO 2005/112991).

Никакой агрегации или разрушения белка не наблюдали с водой для инъекций, адьювантной системой Е или адьювантной системой F. Некоторую агрегацию и разрушение наблюдали с адьювантной системой А. Был сделан вывод, что это является следствием снижения pH ниже изоэлектрической точки СРС-Р501S. Повышение концентрации эксципиента Трис до 50 мМ решало эту проблему, и затем никакой агрегации не наблюдали с адьювантной системой А. Было также обнаружено, что присутствие СрG в лиофилизированном осадке (т.е. совместная лиофилизация антигена и СрG-олигонуклеотида) способствовало предотвращению агрегации антигена при восстановлении адьювантной системой А. Сравнение разведения лиофилизированных осадков с СрG и без него с использованием адьювантной системы А показало сниженную агрегацию после совместной лиофилизации (данные не показаны).

Влияние эксципиентов на размер липосом в адьювантной системе А было также исследовано и было обнаружено отсутствие различия в размере между липосомами, находящимися во флаконе с адьювантной системой А отдельно, и липосомами, находящимися во флаконе с адьювантной системой А после восстановления лиофилизированного осадка, содержащего антиген, СрG, Трис и Твин. Следовательно, авторы изобретения смогли сделать вывод, что компоненты лиофилизированного осадка не влияют на адьювантную систему (фиг. 4).

Наконец, была исследована антигенность препарата, и было обнаружено, что в отношении лимфо-

пролиферации и продуцирования внутриклеточного цитокина (интерферона- λ , ИФН λ) отсутствовало различие между жидким и лиофилизированным препаратом СРС-P501S (данные не показаны). Таким образом, авторы изобретения смогли сделать вывод, что на иммуногенность антигена не влияет совместная лиофилизация с СpG.

Пример 2. Сублимационная сушка СpG-олигонуклеотида и Mage-3 в качестве антигена.

Используемый антиген представлял собой часть белка D, связанного с MAGE-3, который, в свою очередь, был связан с His-хвостом для облегчения очистки PD-Mage3-His (см. фиг. 5: SEQ ID NO: 13).

Очищенную массу антигена продуцировали с His-хвостом в E.coli, а затем доводили до концентрации 750 мкг/мл, используя буфер $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O} / \text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (2 мМ) и Твин 80 приблизительно при 0,2% об./об. (теоретически), pH 7,5.

Для получения конечной массы препарата сахарозу (30%) добавляли в воду для инъекций до получения конечной концентрации 3,15%. Затем добавляли $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O} / \text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (100 мМ, pH 7,5) до получения конечной концентрации PO_4 5 мМ, учитывая фосфат, находящийся в буфере для антигена. Также добавляли Твин 80 (3%) до получения конечной концентрации 0,15%, учитывая Твин, находящийся в буфере для антигена. Эту смесь перемешивали магнитной мешалкой в течение периода времени от 5 до 15 минут при комнатной температуре. Добавляли PD-Mage3-His (750 мкг/мл) и смесь перемешивали магнитной мешалкой в течение 5-15 мин при комнатной температуре. Затем добавляли СpG-олигонуклеотид с SEQ ID NO: 4 и полученную в результате смесь перемешивали магнитной мешалкой в течение 15 минут (± 5 мин) при комнатной температуре с получением конечной массы препарата. Доводили pH до $7,5 \pm 0,1$, используя NaOH 0,05 М или 0,5 М, либо HCl 0,03 М или 0,3 М.

Композицию анализировали следующим образом.

№	Ингредиенты			Перед лиофилизацией		На HD (после разведения 0,625 мл разбавителя)	
	Название	Компонент	Src	СС	Масса (на 0,5 мл)	Концентрация	Масса (на 0,5 мл)
1	PD-Mage3-His	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O} / \text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2 мМ/Твин 80 ~0,2% об./об. теорет., pH 7,5		750 мкг/мл	375 мкг	600 мкг/мл	300 мкг
2	СpG			1250 мкг/мл	625 мкг	1000 мкг/мл	500 мкг
3	Сахароза			3,15% масс./об.	15,75 мг	2,52% масс./об.	12,6 мг
4	Твин 80		1	0,15% масс./об.		0,12% масс./об.	
5	PO_4		1	5 мМ		4 мМ	
6	WFI					до 0,5 мл	
7	pH					$7,5 \pm 0,1$	

0,5 мл этой композиции заполняли в стеклянный флакон, который подвергали циклу лиофилизации, показанному на фиг. 6.

Влияние эксципиентов и цикла сублимационной сушки на состав осадка анализировали через 7-9 суток хранения осадка при 37°C.

Состояние осадка и остаточная влажность.

Состояние осадка	Нет спадения (Т0)	Нет ретракции (Т7 сут. 37°C)
Остаточная влажность	-	0,59% (Т8 сут. 37°C)

Видно, что осадки не проявляют какого-либо спадения через 7 суток и не меняются на протяжении 8 суток по их стабильности в стрессовой среде.

Остаточная влажность осадков, которые хранят в течение 7-9 суток при 37°C, остается ниже спецификации 3%.

Никакого изменения в диаметре не наблюдали после хранения в течение 7-9 суток при 37°C.

Затем осадки разводили адьювантной системой А (липосомный адьювант, приготовленный как описано в WO 2005/112991). Никакой агрегации или разрушения белка не наблюдали, подтвердив, таким образом, что антиген можно лиофилизировать совместно с СpG без влияния на его способность к разведению.

Была исследована антигенность препарата. Было обнаружено, что после разведения в адьювантной системе А имело место снижение антигенности со временем после 24 ч. Посчитали, что это являлось следствием кислого pH ($6,2 \pm 0,1$), обнаруженного после разведения. Это подтвердили, когда обнаружили, что падение антигенности было уменьшено при повышении pH. Однако все же имело место некоторое снижение антигенности со временем. Таким образом, эти препараты были протестированы для проверки того, влияет ли это снижение на испытание эффективности *in vivo*. Разведения 3/10, 1/10 и 1/30 дозы для человека давали группам мышей, 10 мышей на группу, как показано на фиг. 7. У мышей брали кровь на 28 сутки.

T0, 4 ч и 24 ч представляют собой периоды времени после разведения осадка адьювантной системой А. Как видно из фиг. 7, никакого влияния на эффективность не было.

Пример 3. Влияние CpG на растворимость антигена после разведения.

1. WT1 представляет собой белок, сверхэкспрессия которого впервые обнаружена при раке почки у детей, опухоли Вильмса. В антигене-кандидате, применяемом в настоящем случае, используют почти полноразмерный белок в качестве антигена. Белок WT1-A10 представляет собой рекомбинантный слитый белок из 292 аминокислот, экспрессируемый в *E.coli*, состоящий из 12-мерной укороченной последовательности tat (лидерной последовательности) и аминокислот 2-281 последовательности WT1. После лиофилизации одного этого антигена он осаждается при разведении адьювантной системой А из-за его изоэлектрической точки (5,85-7,5), которая находится близко к рН адьювантной системы А (6,1), и присутствия хлорида натрия в адьювантной системе А.

Готовили два препарата WT1-A10. Доза разведенного препарата содержала 400 мкг/мл антигена WT1-A10, 10% сахарозу, 100 мМ Трис и 0,2% Твин 80 плюс или минус 840 мкг/мл CpG.

Оба препарата разводили 500 мкл адьювантной системы А. Полученную в результате жидкость центрифугировали и проводили Вестерн-блоттинг на нецентрифугированной жидкости (NC), супернатанте (SN) и осадке (P). Результаты показаны на фиг. 8.

Как видно из фиг. 8, в присутствии CpG растворимость антигена после разведения улучшается, о чем свидетельствует отсутствие антигена в осадке. Осажденный антиген можно обнаружить в осадке разведенной лиофилизированной композиции, когда лиофилизированный осадок не содержал CpG. Это свидетельствует о том, что в случае антигена, который не является положительно заряженным, совместная лиофилизация с CpG улучшает растворимость антигена при разведении.

2. PRAME.

Готовили два препарата PRAME. Доза разведенного препарата содержала 1000 мкг/мл антигена PRAME, 3,15% сахарозу, 5 мМ борат, 150 нМ хлорид натрия плюс или минус 840 мкг/мл CpG. Оба препарата разводили 500 мкл адьювантной системы А. Полученную в результате жидкость центрифугировали и проводили Вестерн-блоттинг на не центрифугированной жидкости (NC), супернатанте (SN) и осадке (P). Результаты показаны на фиг. 9, где NC означает нецентрифугированную жидкость, SN означает супернатант и P означает осадок.

Как видно из фиг. 9, в присутствии CpG растворимость антигена после разведения улучшается, о чем свидетельствует отсутствие антигена в осадке. Осажденный антиген можно обнаружить в осадке разведенной лиофилизированной композиции, когда лиофилизированный осадок не содержал CpG. Это дополнительно свидетельствует о том, что в случае антигена, который не является положительно заряженным, совместная лиофилизация с CpG улучшает растворимость антигена при разведении.

SEQ ID NO:1
TCC ATG ACG TTC CTG ACG TT

SEQ ID NO:2
TCT CCC AGC GTG CGC CAT

SEQ ID NO:3
ACC GAT GAC GTC GCC GGT GAC GGC ACC ACG

SEQ ID NO:4
TCG TCG TTT TGT CGT TTT GTC GTT

SEQ ID NO:5
TCC ATG ACG TTC CTG ATG CT

SEQ ID NO:6
MKVKETRKNY QHLWRWGTM LGMMLICSAA EQLWVTVYYG VPVWKEATT 50
LFCASDAKAY DTEVHNVWAT HACVPTDPNP QEVVLGNVTE YFNMWKNMNV 100
DQMHEDIISL WDQSLKPCVK LTPLCVTLDC DDVNTNST TTSNGWTGEI 150
RKGEIKNCSF NITTSIRDKV QKEYALFYNL DVVPIDDDNA TTKNKTRNF 200
RLIHCNSSVM TQACPKVSFE PIPHYCAPA GFAILKCNK TFDGKGLCTN 250
VSTVQCTHGI RPVVSTQLLL NGS LAEEEVV IRSDNFMNDT KTIIVQLNES 300
VAINCTRPNN NTRKGIHIGP GRAFYAARKI IGDIRQAHCN LSRAQWNNTL 350
KQIVIKLREH FGNKTIKFNQ SSGGDPEIVR HSFNCGGEFF YCDTTQLFNS 400
TWNTEGNT EGNSTITLPC RIKQIINMWQ EVGKAMYAPP IGGQIRCSSN 450
ITGLLLTRDG GTEGNGTENE TEIFRPGGGD MRDNWRSELY KYKVVKVEPL 500
GVAETRAKRR VVQR 514

SEQ ID NO:7
1 MRVMEIQRNC QHLRWGIMI LGMIIICSTA DNLWVTVYYG VPVWRDAETT
51 LFCASDAKAY STEKHNVWAT HACVPTDPNP QEIPLDNVTE EFNWKNMNV
101 DQMHEDIISL WDQSLKPCVQ LTPLCVTLNC SNARVNATFN STEDREGMKN
151 CSFNMTTELK DKKQVYSLF YRLDIEKINS SNNNSEYRLV NCNTSAITQA
201 CPKVTFEPIP IHYCAPAGFA ILKNDTEFN GTGCKNVST VQCTHGKIPV
251 VSTQLLLNGS LAEREVRIAS ENIANNAKNI IVQFASPVKI NCIRPNNNTR
301 KSYRIGPGQT FYATDIVGDI RQAHCNVSRT DWNNTLRLVA NQLRKYFSNK
351 TIIFTNSSGG DLEITTHSFN CGGEFFYCNT SGLFNSTWTT NMQESNDTS
401 NGTITLPCRI KQIRMWQRV GQAMYAPPIE GVIRCESNIT GLILTRDGGN
451 NNSANETFRP GGGDIRDNWR SELYKYKVVK IEPLGVAPTR AKRRVVEREK
501 RAVGIGAVFL GFLGAAGSTM GAASITLVQ ARQLLSGIVQ QSNLLRAIE
551 AQQQLLKLTV WGIKQLQARV LAVERYLRDQ QLLGIWGCSSG KLICTTNVPW
601 NSSWSNKSVD DIWQNMWLQ WDKEISNYTD IYSLIBESQ NQEKNEQDL
651 LALDKWANLW NWFDISKWLW YIRS

SEQ ID NO:8
1 MGARASVLSG GELDRWEKIR LRPGGKKKYK LKHIVWASRE LERFAVNPGL
51 LETSEGRQI LGQLQPSLQT GSEELRSLYN TVATLYCVHQ RIEIKDTKEA
101 LDKIEEQNK SKKKAQAAA DTGHSNQVSQ NYPIVQNIQG QMVHQAI SPR
151 TLNAWVKVVE EKAFSPEVIP MFSALSEGAT PQDLNMLNT VGGHQAAQM
201 LKETINEEAA EWDRVHPVHA GPIAPGOMRE PRGSDIAGTT STLQEQIGWM
251 TNNPPIPVGE IYKRWIILGL NKIVRMYSPS SILDIRQGGPK EPPRDYVDRF
301 YKTLRAEQAS QEVKNWMTET LLVQANPDC KTIKALGPA ATLEEMTAC
351 QGVGGPGHKA RVLMPISPI ETPVVKLKP MDGPKVKQWP LTEEKIKALV
401 EICTEMEKEG KISKIGPENP YNTPVFAIKK KDSTKWRKLV DFRELNRKRTQ

451 DFWEVQLGIP HPAGLKKKS VTVLDVGDAY FSVPLDEDFR KYTAFTIPSI
 501 NNETPGIRYQ YNVLPQGWKG SPAIFQSSMT KILEPFRKQN PDIYIYQYMD
 551 DLYVGSLEI GQHRTKIEEL RQHLLRWGLT TPKKHQKEP PFLKMGYELH
 601 PDKWTVQPIV LPEKDSWTVN DIQKLVGKLN WASQIYFGIK VRQLCKLLRG
 651 TKALTEVIPL TEEAELELAE NRELKKEPVH GVIYDPSKDL IAEIQKQGGG
 701 QWTYQIYQEP FKNLKTGKYA RMRGAHTNDV KQLTEAVQKI TTESIVIWKG
 751 TPKFKLPIQK ETWETWTEY WQATWIPEWE FVNTPLVLKL WYQLEKEPIV
 801 GAETFYVDGA ANRETKLGKA GYVTVNRGRQK VVTLTDTTNQ KTELQAIYLA
 851 LQDSGLEVNI VTDSQYALGI IQAOPDQSES ELVNQIIEQL IKKEKVYLAW
 901 VPAHKGIGGN EQVDKLVASG IRKVLVMGFF VTPQVPLRPM TYKAAVDLSH
 951 FLKEKGGLEG LIHSQRRQDI LDLWIYHTQG YFPDQNYTP GPGVRYPLTF
 1001 GWCYKLVPE PDKVEANKG ENTSLLHPVS LHGMDDPERE VLEWRFSRL
 1051 AFHHVARELH PEYFKNC

SEQ ID NO: 9

atgggtatcgtgcagaacatccaggggcaaaatgggtacatcaggccatataccctagaaactttaaatgcatggg
 taaaagtagtagagagaaggctttcagccagaagtaataccatggtttcagcattatcagaaggagccac
 cccacaagatttaaacacatgctaaacacagtggtggggacatcaagcagccatgcaaatggttaaaagagacc
 atcaatgaggaagctgcagaatgggtagagtagatcaccagtgcatgcaggccatattgcaccaggccagatga
 gaaaccaagggaagtgacatagcaggaaactactagctacccttcaggaaacaaataggatggatgacaaataa
 tccacctatccagtaggagaaatataaaagatggataatcctgggattaaataaaatagtaagaatgtat
 agcctaccagcattctggacataagacaaggacaaagaacaccttttagagactatgtagaccggttctata
 aaacttaagagccagcaagcttcacaggaggttaaaaaatggatgacagaaacacctgttgggtccaaatgc
 gaaccagatgtgaagactatataaaagcattgggaccagggctacactagaagaaatgtagacagcagatgt
 caggagtagaggaccggccataaggcaagagttttgcatatggggcccatagccctattgagactgtgt
 cagtaaaatataagccaggaatggatggcccaaaagttaaacatggccattgacagaaagaaaaataaaagc
 attagtagaaatgtgtacagagatggaaaaggaaggaaatccaaaatgggctgaaaatccatatacaat
 actccagatattgccataaagaaaaagacagtagtaaatggagaaaaatagtagatttcagagaacttaata
 agagaactcaagactctctgggaagttcaattaggaataccacatcccgaggggttaaaaaagaaaaaatcagt
 aacagtagagacaacatctgttgaggtgggacttaccacaccagacaaaaaacatcagaaagaaacctccattc
 accatacctagtataaaacatgagacaccagggttagatatacagtagcaatgtgcttccacagggtatggaaag
 gatcaccagcaaatattccaaagtagcatgacaaaaatcttagagccttttagaaaaacaaatccagacatagt
 tatctatcaatacatggatgattgtatgtaggactgacttagaaaaatgggcagcatagaacaaaaatagag
 gagctgagacaacatctgttgaggtgggacttaccacaccagacaaaaaacatcagaaagaaacctccattcc
 ttaaaatgggttatgaaactcctctgataaaatggacagtagcctatagtgctgccagaaaaagacagctg
 gactgtcaatgacatacagaagtagtggggaaatgaaatgggcaagtagcatttaccagggtataagtaga
 aggcaattatgtaaaactccttagaggaaccaaagcactaacagaagtaataaccactaacagaagagcagagc
 tagaactggcagaaaaacagagagattctaaaagaccagtagatggaggtattatgacccatcaaaagactt
 aatagcagaaatcagaaagcaggggcaagcccaatggacatatacaatattcaagagccatttaaaatctg
 aaaacaggaaatatagaagaatgaggggtgcccacactaatgatgtaaaacaataacagagggcagtgcaaa
 aataaacacagaaagcatagtaataatggggaagactcctaaatataaactgccatcaaaaggaacaatg
 ggaaacatggtggacagagtagtggaagccacctggattcctgagtgagggtttgttaataccctccttta
 gtgaaatattggtaccagttagagaaagaaccatagtaggagcagaaacctctatgtagatggggcagctta
 acagggagactaaataggaagcagagtagtacttaataagaggaacaaaaaggtgtcaccctaaactga
 cacaacaaatcagaagactgagttacaagcaatttatctagcttgcaggattcgggattagaagtaaacata
 gtaacagactcacaataatgcattaggaatcattcaagcacaaccagatcaaaagtaacagagttagtagcaatc
 aaataatagagcagttataaaaaaggaaggtctctctggcatgggtaccagcacaacaaaggaatggaggg
 aatgaaacaagtagataaaatagtcagtgctggaatcaggaaagtgctagctatgggtggcaaggtggtaaaa
 agtagtggtgtggatggcctactgtaaggaagaaatgagacagagctgagccagcagcagatgggggtgggag
 cagcatctcagagacctggaaaaacatggagcaatcacaagtagcaatcacagcagctaccaatgctgctgtgct
 ctggctagaagcacaagaggaggagggtgggtttccagtcacacctcaggtacctttaagaccaatgact
 tacaagcagctgtagatcttagccacttttaaaagaaaagggggactggaaagggctaatctactcccaac
 gaagacaagatattccttgatctgtggatctaccacacacaaggctacttccctgattggcagaactacacacc
 agggccaggggtcagatatccactgacctttggatgggtgctacaagctagtaccagttgagccagataaggtta
 gaagagggccaaataaaggagagaaacacagcttggtaacacctgtgagcctggcatggaaatggatgacctgaga
 gagaaggttagagtgagggtttgacagccgctagcatttcatcacgtggcccgagagctgcatccggagtta
 ctcaagaactgtaggctttaggggtgagagagcgtcagtagtaagcgggggagaattagatcagtagggaaaaa
 attcggttaagggccagggggaaagaaaaataataataaaacataatgtagttagggcaagcagggagctagaac
 gattcagcagtaactcctggcctgtagaaacatcagaagcgtgtagacaaatactgggacagctacaaccatc

ccttcagacaggatcagaagaacttagatcattatataatacagtagcaaccctctattgtgtgcatcaaagg
atagagataaaagacaccaaggaagcttttagacaagatagaggaagacaaaacaaaagtaagaaaaaagcac
agcaagcagcagctgacacaggacacagcaatcaggtcagccaaaattactaa

SEQ ID NO:10
MVIQNIQGMVHQAI SPRTLNAWVKVVEEKAFSPEVIMFSALESEGATP 50
QDLNTMLNTVGGHQAAAMQMLKETINEEAAEWDVRVHPVHAGPIAPGQMRP 100
RGSIDIAGTTSTLQEQIGWMTNPPFIPVGEIYKRWIILGLNKIVRMYSPFS 150
ILDIRQCFKPEFRDYVDRFYKTLRAEQASQEVKNWMTETLLVQANPDC 200
TILKALGPAATLEEMMTACQGVGGPGHKARVLIHMGPISPIETVSVKLLKPG 250
MDGPKVKQWPLTEEKIKALVEICTEMEKEGKISKIGPENPYNTPVFAIKK 300
KDSTKWRKLVDFRELNKRTQDFWEVQLGIPHPAGLKKKKSVTVLVDVGDAY 350
FSVPLDEDFRKYTAFTIPSINNETPGIRYQYNVLPQGWKGSFAIFQSSMT 400
KILEPFRKQNPDIYIYQYMDLIVGSDLEIGQHRTKIEELRQHLLRWGLT 450
TPDKKHQKPEPFLQMGYELHPDKWTVQPIVLPKEDSWTVNDIQKLVGKLN 500
WASQIYFGIKVRQLCKLLRGTKALTEVIPLEEAELELAENREILKEPVH 550
GVYYDPSKDLTAEIQKQGGQWTYQIYQEPFKNLKTKGYARMRGAHTNDV 600
KQLTEAVQKITTESIVINGKTPKFKLPIQKETWETWTEYQATWIPEWE 650
FVNTPLVWKLYQLEKEPIVGAETFFYVDGAANRETILGKAGYVTRGRQK 700
VVLTDTTNTQKTELQAIYLALQDSGLEVNIIVTDSQYALGIQAQPDQSES 750
ELVNIIEQLIKKEKVVYLAWVPAHKGIGGNEQVQDKLVSAGIRKVLAMGGK 800
WSKSSVVGWPTVREMRRAEPAADGVGAASRDLEKHGAITSSNTAATNAA 850
CAWLEAQEEVEGFPVTPQVPLRPMTYKAAVDLSHFLKEKGGLEGLIHSQ 900
RRQDILDLMYHTQGYFPDQWNYTPGPGVRYPLTFGWICYKLVPEPDKVE 950
EANKGENTSLLHPVSLHGMDDPEREVLEWRFDRLAFHHVARELHPEYFK 1000
NCFPMGARASVLSGGELDRWEKIRLRPGGKKKYKLLKHIVWASRELERFAV 1050
NPGLEETSEGCRIILGQLQPSLQGTGSEELRSLYNTVATLYCVHQRIEIKD 1100
TKEALDKIEEEQNKSKKKAQAAAADTGHNSQVSNQY 1136

SEQ ID NO:11
1 MAARASILSG GKLDWEKIR LRPGGKKKYR LKHLVWASRE LDRFALNPSL
51 LETTEGCQOI MNQLQPAVKT GTEEIKSLFN TVATLYCVHQ RIDVKDTKEA
101 LDKIEEIQNK SKQKTQAAA DTGDSKVSQ NYPPIQNAQG QMIHQNLSPR
151 TLNAWVKVIE EKAFSPEVIP MFSALEGAT PQDLNVMLNI VGGHQAAAMQ
201 LKDTINEEAA EWDRLHPVQA GPIPPGQIRE PRGSDIAGTT STPQEQIQWM
251 TGNPPIPVGN IYKRWIILGL NKIVRMYSPV SILDIKQGPK EPFRDYVDRF
301 FKALRAEQAT QDVKGWMTET LLVQANPDC KSILKALGSG ATLEEMMTAC
351 QGVGGPGHKA RVLAEAMSQA QQTNIMMQRG NFRGQKRIK FNCGKEGHLA
401 RNCRAPRKKK CWKCGKEGHQ MKDCTERQAN FLGKIWPSSK GRPGNFPQSR
451 PEPTAPPAEL FGMGEGIASL PKQEQKDREQ VPPLVSLKSL FGNPPLSQGS
501 PISPIETVPV TLKPGMDGPK VKQWFLTEEK IKALTEICTE MEKEGKISKI
551 GPENPYNTPI FAIKKDKSTK WRKLVDFREL NKRTQDFWEV QLGIHPAGL
601 KKKKSVTVLD VGDAYFSVPL DENFRKYTAF TIPSTNNETP GVRVYQYNVLP
651 QGWKGSFAIF QSSMTKILEP FRSKNPEIII YQYMAALYVG SDLEIGQHRT
701 KIEELRAHLL SWGFTTPDKK HQKEPPFLWM GYELHPDKWT VQFIMLPDKE
751 SWTVNDIQKL VGKLNWASQI YAGIKVKQLC RLLRGAKALT DIVTLTEEAE
801 LELAENREIL KDPVHGVYD PSKDLVAEIQ KQGQDQWTYQ IYQEPFKNLK
851 TGKYARKRSA HTNDVRQLAE VVQKVAMESI VIWGTTPKFK LPIQKETWET
901 WWMYDQATW IPEWEFVNTP PLVKLWYQLE KDPILGAETF YVDGAANRET
951 KLGKAGVYTD RGRQKVVSLT ETTNQTTELH AILLALQDSG SEVNIIVTDSQ
1001 YALGIIQAQP DRSESELVQ IIEKLGKDK IYLSWVPAHK GIGGNEQVVK
1051 LVSSGIRKVL FLDGIDKAQE DHERYHSNWR TMADEFNLPP IVAKEIVASC
1101 DKCQLKGEAM HGQVDCSPGI WQLACTHLEG KVILVAVHVA SGYIEAEVIP
1151 AETQETAYF LKLAGRWPV KVVHTANGSN FTSAAVKAAC WWANIQQEFG
1201 IPYNPQSQGV VASMNKELKK IIGQVRDQAE HLKTAVQMAV FIHNFRKGG
1251 IGGYSAGERI IDIIATDIQT KELQKQITKI QNFRVYRDS RDPWIKGPAK
1301 LGWKEGAVV IQDNSDIKVV PRRKAKILRD YGKQMGDDC VAGRQEDRS
1351 MGGKWSKSGI VGWPEIRERM RRAPAAAPGV GAVSQDLKX GAITSSNINN
1401 PSCVWLEAQE EEEVGFVVRP QVPLRPMTYK GAFDLSHFLK EKGGLDGLIY
1451 SRKRQEILDL WVYHTQGYFP DWQNYTPGFG VRYPLTFGWC FKLVPMEPDE
1501 VEKATEGENN SLLHPICQHG MDDEEREVLI WKFD SRLALK HRAQELHPEF
1551 YKDC

SEQ ID NO:12

Benox_D_H influenzae (1) MKLKTALSLAAGVLACSSSHSNMANTOMKSDKIIIAHRGASGYLPEH
51) TLESKALAFQAQADYLEQDLAMTKDGRLLVVIHDFLDGLTDVAKKFPHRH (101) RFDGRYVIDFTLKEIQSLEMTENFET

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Лиофилизованная композиция для лечения рака, содержащая один или более чем один антиген, который не является положительно заряженным, и CpG-содержащий иммуностимулирующий олигонуклеотид, где указанный один или более чем один антиген представляет собой антиген WT-1 (белок опухоли Вильмса) или его производное или фрагмент, где указанное производное в достаточной степени подобно нативным антигенам в сохранении антигенных свойств и сохранении способности обеспечивать иммунный ответ, который должен быть вызван против WT-1, и где указанный фрагмент имеет по меньшей мере 8 аминокислот в длину и способен индуцировать иммунный ответ, который перекрестно реагирует с природным WT-1.

2. Композиция по п.1, где указанный иммуностимулирующий олигонуклеотид содержит последовательность: пурин, пурин, С, G, пиримидин, пиримидин.

3. Композиция по п.1 или 2, где указанный иммуностимулирующий олигонуклеотид выбран из группы, включающей

TCC ATG ACG TTC CTG ACG TT (SEQ ID NO: 1);

TCT CCC AGC GTG CGC CAT (SEQ ID NO: 2);

ACC GAT GAC GTC GCC GGT GAC GGC ACC ACG (SEQ ID NO: 3);

TCG TCG TTT TGT CGT TTT GTC GTT (SEQ ID NO: 4);

TCC ATG ACG TTC CTG ATG CT (SEQ ID NO: 5).

4. Композиция по п.1 или 2, где иммуностимулирующий олигонуклеотид содержит по меньшей мере два неметилированных повтора CG, разделенных по меньшей мере 3 нуклеотидами.

5. Композиция по п.4, где иммуностимулирующий олигонуклеотид содержит по меньшей мере два неметилированных повтора CG, разделенных 6 нуклеотидами.

6. Способ изготовления лиофилизованной композиции по любому из пп.1-5, включающий стадии смешивания желаемого антигена и иммуностимулирующего олигонуклеотида с подходящими эксципиентами и осуществления цикла лиофилизации полученного препарата.

7. Способ изготовления иммуногенной композиции, включающий стадии разведения лиофилизованной композиции по любому из пп.1-5 подходящим носителем.

8. Способ по п.7, где указанный носитель представляет собой носитель в форме частиц, выбранный из группы, включающей минеральные соли, эмульсии, полимеры, липосомы, иммуностимулирующие комплексы (ISCOM).

9. Способ по п.7, где указанный носитель представляет собой раствор липосом или эмульсию масло-в-воде.

10. Способ по любому из пп.7-9, где указанный носитель дополнительно содержит один или более чем один иммуностимулятор.

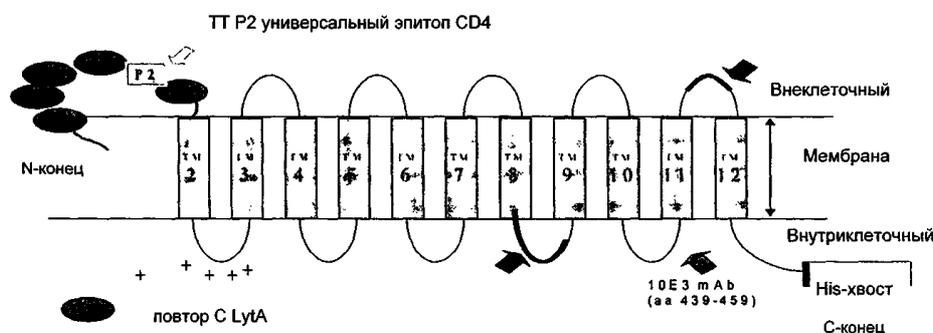
11. Способ по п.10, где указанный один или более чем один иммуностимулятор выбран из группы, состоящей из агонистов Toll-подобного рецептора (TLR4), антагонистов TLR4, сапонинов, агонистов TLR7, агонистов TLR8, агонистов TLR9.

12. Способ по п.11, где указанный антагонист TLR4 представляет собой 3-деацелированный монофосфориллипид А (MPL).

13. Способ по п.11, где указанный сапонин представляет собой QS21.

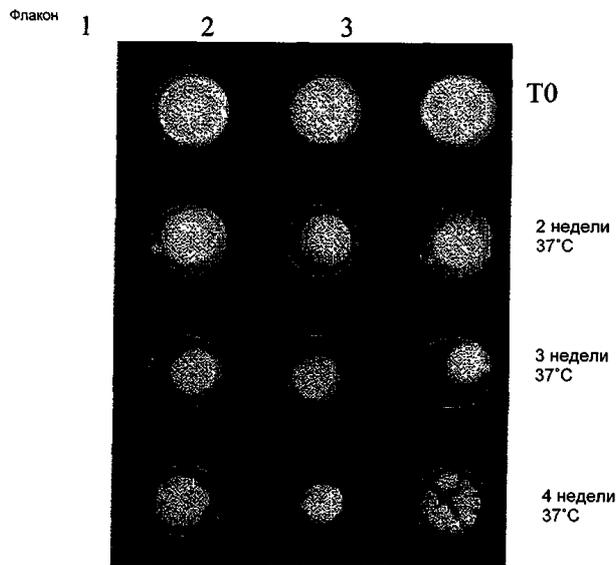
14. Способ по п.10, где указанный носитель содержит два иммуностимулятора.

15. Способ по п.14, где указанные иммуностимуляторы представляют собой 3-деацелированный MPL и QS21.





Фиг. 2



Фиг. 3



Фиг. 4

Белок LipoD1/3-MAGE3-HIS:

N-конец MDP	белок D 1/3	Met ASP	Mage 3	GlyGly 7xHis	C-конец
2	124	3	314		

SEQ ID NO:13

```

MDPKTLALSLLAAGVLAGCSSHSSNMANTQMKSDKII IAH 40
RGASGYLPEHTLESKALAFQAQADYLEQDLAMTKDGRLLV 80
IHDHFLDGLTDVAKKFPHRHRKDGRIYVIDFTLKEIQSLE 120
MTENFETMDLEQRSQHCKPEEGLEARGEALGLVGAQAPAT 160
EEQEAASSSSTLVEVTLGEVPAAESPDPPQSPQGASSLPT 200
TMNYPLWSQSYEDSSNQEEGPGSTFPDLESEFQAALSRKV 240
AELVHFLLKRYRAREPVTKAEMIGSVVGNWQYFFPVI FSK 280
ASSSLQLVFGIELMEVDFIGHLYIFATCLGLSYDGLLGDN 320
QIMPKAGLLIIVLAI IAREGDCAPEEKIWEELSVLEVFEG 360
REDSILGDPKLLTQHFFVQENYLEYRQVPGSDPACYEFLW 400
GPRALVETSIVKVLHNMVKISGGPHISYPPLHEWVLRGE 440
EGGHHHHHHH. 451

```

Красный=сигнальная последовательность 15 аминокислот

Синий=первые 109 аминокислот белка D

Розовый=неродственные аминокислоты

* (MDP первые аминокислоты вируса гриппа)

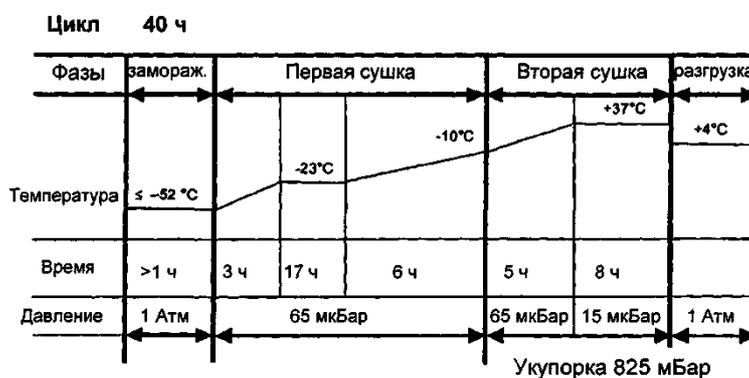
* (Met-Asp по аминокислотам 128-129 для создания сайта клонирования)

* (Gly-Gly по 442-443)

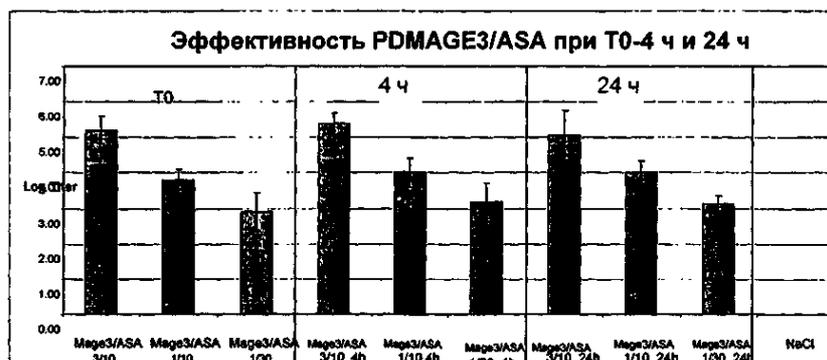
Зеленый=фрагмент MAGE3; аминокислоты 3-314 MAGE3 (всего 312 аминокислот)

Оранжевый=хвост 7 his

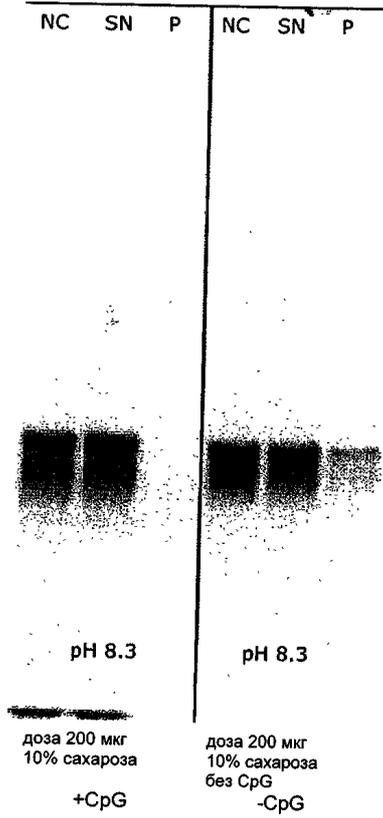
Фиг. 5



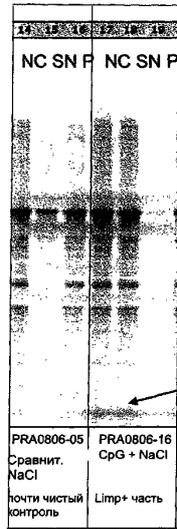
Фиг. 6



Фиг. 7



Фиг. 8



- CrG + CrG

Фиг. 9

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> Лемуан, Доминик
 <120> Лиофилизированная антигенная композиция

 <130> VB62731

 <150> PCT/EP2007/055037
 <151> 05-24-2007

 <150> 0723044.4
 <151> 11-23-2007

 <150> 0723900.7
 <151> 12-06-2007

 <160> 12

 <170> FastSEQ для Windows версия 4.0

 <210> 1
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Синтезированный олигонуклеотид

 <400> 1
 tccatgacgt tcctgacgt 20

 <210> 2
 <211> 18
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Синтезированный олигонуклеотид

 <400> 2
 tctccsagcg tgcgcat 18

 <210> 3
 <211> 30
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Синтезированный олигонуклеотид

 <400> 3
 accgatgacg tcgcccgtga cggcaccacg 30

 <210> 4
 <211> 24
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Синтезированный олигонуклеотид

 <400> 4

tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt

24

<210> 5
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтезированный олигонуклеотид

<400> 5
 tccatgacgt tcctgatgct

20

<210> 6
 <211> 514
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> слитый белок

<400> 6
 Met Lys Val Lys Glu Thr Arg Lys Asn Tyr Gln His Leu Trp Arg Trp
 1 5 10 15
 Gly Thr Met Leu Leu Gly Met Leu Met Ile Cys Ser Ala Ala Glu Gln
 20 25 30
 Leu Trp Val Thr Val Tyr Tyr Gly Val Pro Val Trp Lys Glu Ala Thr
 35 40 45
 Thr Thr Leu Phe Cys Ala Ser Asp Ala Lys Ala Tyr Asp Thr Glu Val
 50 55 60
 His Asn Val Trp Ala Thr His Ala Cys Val Pro Thr Asp Pro Asn Pro
 65 70 75 80
 Gln Glu Val Val Leu Gly Asn Val Thr Glu Tyr Phe Asn Met Trp Lys
 85 90 95
 Asn Asn Met Val Asp Gln Met His Glu Asp Ile Ile Ser Leu Trp Asp
 100 105 110
 Gln Ser Leu Lys Pro Cys Val Lys Leu Thr Pro Leu Cys Val Thr Leu
 115 120 125
 Asp Cys Asp Asp Val Asn Thr Thr Asn Ser Thr Thr Thr Ser Asn
 130 135 140
 Gly Trp Thr Gly Glu Ile Arg Lys Gly Glu Ile Lys Asn Cys Ser Phe
 145 150 155 160
 Asn Ile Thr Thr Ser Ile Arg Asp Lys Val Gln Lys Glu Tyr Ala Leu
 165 170 175
 Phe Tyr Asn Leu Asp Val Val Pro Ile Asp Asp Asp Asn Ala Thr Thr
 180 185 190
 Lys Asn Lys Thr Thr Arg Asn Phe Arg Leu Ile His Cys Asn Ser Ser
 195 200 205
 Val Met Thr Gln Ala Cys Pro Lys Val Ser Phe Glu Pro Ile Pro Ile
 210 215 220
 His Tyr Cys Ala Pro Ala Gly Phe Ala Ile Leu Lys Cys Asn Asn Lys
 225 230 235 240
 Thr Phe Asp Gly Lys Gly Leu Cys Thr Asn Val Ser Thr Val Gln Cys
 245 250 255
 Thr His Gly Ile Arg Pro Val Val Ser Thr Gln Leu Leu Leu Asn Gly
 260 265 270
 Ser Leu Ala Glu Glu Val Val Ile Arg Ser Asp Asn Phe Met Asp
 275 280 285
 Asn Thr Lys Thr Ile Ile Val Gln Leu Asn Glu Ser Val Ala Ile Asn
 290 295 300
 Cys Thr Arg Pro Asn Asn Asn Thr Arg Lys Gly Ile His Ile Gly Pro
 305 310 315 320
 Gly Arg Ala Phe Tyr Ala Ala Arg Lys Ile Ile Gly Asp Ile Arg Gln
 325 330 335

018201

Ala His Cys Asn Leu Ser Arg Ala Gln Trp Asn Asn Thr Leu Lys Gln
 340 345 350
 Ile Val Ile Lys Leu Arg Glu His Phe Gly Asn Lys Thr Ile Lys Phe
 355 360 365
 Asn Gln Ser Ser Gly Gly Asp Pro Glu Ile Val Arg His Ser Phe Asn
 370 375 380
 Cys Gly Gly Glu Phe Phe Tyr Cys Asp Thr Thr Gln Leu Phe Asn Ser
 385 390 395 400
 Thr Trp Asn Gly Thr Glu Gly Asn Asn Thr Glu Gly Asn Ser Thr Ile
 405 410 415
 Thr Leu Pro Cys Arg Ile Lys Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln Glu Val
 420 425 430
 Gly Lys Ala Met Tyr Ala Pro Pro Ile Gly Gly Gln Ile Arg Cys Ser
 435 440 445
 Ser Asn Ile Thr Gly Leu Leu Leu Thr Arg Asp Gly Gly Thr Glu Gly
 450 455 460
 Asn Gly Thr Glu Asn Glu Thr Glu Ile Phe Arg Pro Gly Gly Gly Asp
 465 470 475 480
 Met Arg Asp Asn Trp Arg Ser Glu Leu Tyr Lys Tyr Lys Val Val Lys
 485 490 495
 Val Glu Pro Leu Gly Val Ala Pro Thr Arg Ala Lys Arg Arg Val Val
 500 505 510
 Gln Arg

<210> 7
 <211> 674
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> слитый белок

<400> 7
 Met Arg Val Met Glu Ile Gln Arg Asn Cys Gln His Leu Leu Arg Trp
 1 5 10 15
 Gly Ile Met Ile Leu Gly Met Ile Ile Ile Cys Ser Thr Ala Asp Asn
 20 25 30
 Leu Trp Val Thr Val Tyr Tyr Gly Val Pro Val Trp Arg Asp Ala Glu
 35 40 45
 Thr Thr Leu Phe Cys Ala Ser Asp Ala Lys Ala Tyr Ser Thr Glu Lys
 50 55 60
 His Asn Val Trp Ala Thr His Ala Cys Val Pro Thr Asp Pro Asn Pro
 65 70 75 80
 Gln Glu Ile Pro Leu Asp Asn Val Thr Glu Glu Phe Asn Met Trp Lys
 85 90 95
 Asn Asn Met Val Asp Gln Met His Glu Asp Ile Ile Ser Leu Trp Asp
 100 105 110
 Gln Ser Leu Lys Pro Cys Val Gln Leu Thr Pro Leu Cys Val Thr Leu
 115 120 125
 Asn Cys Ser Asn Ala Arg Val Asn Ala Thr Phe Asn Ser Thr Glu Asp
 130 135 140
 Arg Glu Gly Met Lys Asn Cys Ser Phe Asn Met Thr Thr Glu Leu Arg
 145 150 155 160
 Asp Lys Lys Gln Gln Val Tyr Ser Leu Phe Tyr Arg Leu Asp Ile Glu
 165 170 175
 Lys Ile Asn Ser Ser Asn Asn Asn Ser Glu Tyr Arg Leu Val Asn Cys
 180 185 190
 Asn Thr Ser Ala Ile Thr Gln Ala Cys Pro Lys Val Thr Phe Glu Pro
 195 200 205
 Ile Pro Ile His Tyr Cys Ala Pro Ala Gly Phe Ala Ile Leu Lys Cys
 210 215 220
 Asn Asp Thr Glu Phe Asn Gly Thr Gly Pro Cys Lys Asn Val Ser Thr

<220>

<223> слитый белок

<400> 8

Met Gly Ala Arg Ala Ser Val Leu Ser Gly Gly Glu Leu Asp Arg Trp
 1 5 10 15
 Glu Lys Ile Arg Leu Arg Pro Gly Gly Lys Lys Lys Tyr Lys Leu Lys
 20 25 30
 His Ile Val Trp Ala Ser Arg Glu Leu Glu Arg Phe Ala Val Asn Pro
 35 40 45
 Gly Leu Leu Glu Thr Ser Glu Gly Cys Arg Gln Ile Leu Gly Gln Leu
 50 55 60
 Gln Pro Ser Leu Gln Thr Gly Ser Glu Glu Leu Arg Ser Leu Tyr Asn
 65 70 75 80
 Thr Val Ala Thr Leu Tyr Cys Val His Gln Arg Ile Glu Ile Lys Asp
 85 90 95
 Thr Lys Glu Ala Leu Asp Lys Ile Glu Glu Glu Gln Asn Lys Ser Lys
 100 105 110
 Lys Lys Ala Gln Gln Ala Ala Asp Thr Gly His Ser Asn Gln Val
 115 120 125
 Ser Gln Asn Tyr Pro Ile Val Gln Asn Ile Gln Gly Gln Met Val His
 130 135 140
 Gln Ala Ile Ser Pro Arg Thr Leu Asn Ala Trp Val Lys Val Val Glu
 145 150 155 160
 Glu Lys Ala Phe Ser Pro Glu Val Ile Pro Met Phe Ser Ala Leu Ser
 165 170 175
 Glu Gly Ala Thr Pro Gln Asp Leu Asn Thr Met Leu Asn Thr Val Gly
 180 185 190
 Gly His Gln Ala Ala Met Gln Met Leu Lys Glu Thr Ile Asn Glu Glu
 195 200 205
 Ala Ala Glu Trp Asp Arg Val His Pro Val His Ala Gly Pro Ile Ala
 210 215 220
 Pro Gly Gln Met Arg Glu Pro Arg Gly Ser Asp Ile Ala Gly Thr Thr
 225 230 235 240
 Ser Thr Leu Gln Glu Gln Ile Gly Trp Met Thr Asn Asn Pro Pro Ile
 245 250 255
 Pro Val Gly Glu Ile Tyr Lys Arg Trp Ile Ile Leu Gly Leu Asn Lys
 260 265 270
 Ile Val Arg Met Tyr Ser Pro Thr Ser Ile Leu Asp Ile Arg Gln Gly
 275 280 285
 Pro Lys Glu Pro Phe Arg Asp Tyr Val Asp Arg Phe Tyr Lys Thr Leu
 290 295 300
 Arg Ala Glu Gln Ala Ser Gln Glu Val Lys Asn Trp Met Thr Glu Thr
 305 310 315 320
 Leu Leu Val Gln Asn Ala Asn Pro Asp Cys Lys Thr Ile Leu Lys Ala
 325 330 335
 Leu Gly Pro Ala Ala Thr Leu Glu Glu Met Met Thr Ala Cys Gln Gly
 340 345 350
 Val Gly Gly Pro Gly His Lys Ala Arg Val Leu Met Gly Pro Ile Ser
 355 360 365
 Pro Ile Glu Thr Val Pro Val Lys Leu Lys Pro Gly Met Asp Gly Pro
 370 375 380
 Lys Val Lys Gln Trp Pro Leu Thr Glu Glu Lys Ile Lys Ala Leu Val
 385 390 395 400
 Glu Ile Cys Thr Glu Met Glu Lys Glu Gly Lys Ile Ser Lys Ile Gly
 405 410 415
 Pro Glu Asn Pro Tyr Asn Thr Pro Val Phe Ala Ile Lys Lys Lys Asp
 420 425 430
 Ser Thr Lys Trp Arg Lys Leu Val Asp Phe Arg Glu Leu Asn Lys Arg
 435 440 445
 Thr Gln Asp Phe Trp Glu Val Gln Leu Gly Ile Pro His Pro Ala Gly
 450 455 460
 Leu Lys Lys Lys Lys Ser Val Thr Val Leu Asp Val Gly Asp Ala Tyr
 465 470 475 480

018201

Gly Val Arg Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Trp Cys Tyr Lys Leu Val Pro
 995 1000 1005
 Val Glu Pro Asp Lys Val Glu Ala Asn Lys Gly Glu Asn Thr Ser
 1010 1015 1020
 Leu Leu His Pro Val Ser Leu His Gly Met Asp Asp Pro Glu Arg Glu
 1025 1030 1035 1040
 Val Leu Glu Trp Arg Phe Asp Ser Arg Leu Ala Phe His His Val Ala
 1045 1050 1055
 Arg Glu Leu His Pro Glu Tyr Phe Lys Asn Cys
 1060 1065

<210> 9

<211> 3411

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> нуклеиновая кислота, кодирующая слитый белок

<400> 9

atggttatcg tgcagaacat ccaggggcaa atggtacatc aggccatatac acctagaact 60
 ttaaatgcat ggttaaaagt agtagaagag aaggctttca gcccagaagt aatacccatg 120
 ttttcagcat tatcagaagg agccacccca caagatttaa acaccatgct aaacacagtg 180
 gggggacatc aagcagccat gcaaatgtta aaagagacca tcaatgagga agctgcagaa 240
 tgggatagag tacatccagt gcatgcaggg cctattgcac caggccagat gagagaacca 300
 aggggaagtg acatagcagg aactactagt acccttcagg acaaaatagg atggatgaca 360
 aataatccac ctatcccagt aggagaaatt tataaaagat ggataatcct gggattaaat 420
 aaaatagtaa gaatgtatag ccctaccagc attctggaca taagacaagg accaaaagaa 480
 ccttttagag actatgtaga ccggttctat aaaactctaa gagccgagca agcttcacag 540
 gaggtaaaaa attggatgac agaaaacctg ttggtccaaa atgcgaacct agattgtaag 600
 actattttaa aagcattggg accagcggct acaactagaag aaatgatgac agcatgtcag 660
 ggaataggag gaccggcca taaggcaaga gttttgcata tgggccccat tagcctatt 720
 gagactgtgt cagtaaaatt aaagccagga atggatggcc caaaagttaa acaatggcca 780
 ttgacagaag aaaaaataaa agcattagta gaaatttcta cagagatgga aaaggaaggg 840
 aaaaattcaa aaattgggccc tgaaaatcca tacaatactc cagtatttgc cataaagaaa 900
 aaaagacagta tcaaatggag aaaattagta gatttcagag aacttaataa gagaactcaa 960
 gacttctggg aagttcaatt aggaatacca catcccagc ggttaaaaaa gaaaaaatca 1020
 gtaacagtac tggatgtggg tgatgcatat ttttcagttc ccttagatga agacttcagg 1080
 aaatatactg catttaccat acctagtata aacaatgaga caccagggat tagatatcag 1140
 tacaatgtgc ttccacaggg atggaaagga tcaccagcaa tattccaaag tagcatgaca 1200
 aaaaacttag agccttttag aaaaacaaat ccagacatag ttatctatca atacatggat 1260
 gatttgtatg taggatctga cttagaataa gggcagcata gaacaaaaat agaggagctg 1320
 agacaacatc tgttgaggtg gggacttacc acaccagaca aaaaacatca gaaagaacct 1380
 ccattcctta aaatgggta tgaactccat cctgataaat ggacagtaca gcctatagtg 1440
 ctgccagaaa aagacagctg gactgtcaat gacatacaga agttagtggg gaaattgaaat 1500
 tgggcaagtc agatttacc agggattaaa gtaaggcaat tatgtaaaact ccttagagga 1560
 accaaagcac taacagaagt aataccacta acagaagaag cagagctaga actggcagaa 1620
 aacagagaga ttctaaaaga accagtacat ggagtgtatt atgacctc aaaagactta 1680
 atagcagaaa tacagaagca ggggcaaggc caatggacat atcaaattta tcaagagcca 1740
 tttaaaaatc tgaaaacagg aaaaatgca agaatgaggg gtgcccacac taatgatgta 1800
 aaaaatttaa cagaggcagt gcaaaaaata accacagaaa gcatagtaat atggggaaag 1860
 actcctaata ttaactgcc catacaaaag gaaacatggg aaacatggtg gacagagtat 1920
 tggcaagcca cctggattcc tgagtgggag tttgttaata cccctcctt agtgaaatta 1980
 tggtagcagt tagagaaaga acccatagta ggagcagaaa ccttctatgt agatggggca 2040
 gctaacaggg agactaaatt aggaaaagca ggatattgta ctaatagagg aagacaaaaa 2100
 gttgtcacc taactgacac aacaaatcag aagactgagt tacaagcaat ttatctagct 2160
 ttgcaggatt cgggattaga agtaaacata gtaacagact cacaatatgc attaggaatc 2220
 attcaagcac aaccagatca aagtgaatca gagttagtca atcaataat agagcagtta 2280
 ataaaaaagg aaaaggtcta tctggcatgg gtaccagcac acaaggaat tggaggaaat 2340
 gaacaagtag ataaattagt cagtgtctgga atcaggaaag tgctagctat ggggtggcaag 2400
 tggtcaaaaa gtagtgtggg ttgatggcct actgtaaggg aaagaatgag acgagctgag 2460
 ccagcagcag atgggggtggg agcagcatct cgagacctgg aaaaacatgg agcaatcaca 2520
 agtagcaata cagcagctac caatgctgct tgtgctggc tagaagcaca agaggaggag 2580

```

gaggtgggtt ttccagtcac acctcaggta cctttaagac caatgactta caaggcagct 2640
gtagatctta gccacttttt aaaagaaaag gggggactgg aagggctaat tcaactcccaa 2700
cgaagacaag atataccttga tctgtggatc taccacacac aaggctactt ccctgattgg 2760
cagaactaca caccagggcc aggggtcaga tatccactga cctttggatg gtgctacaag 2820
ctagtaccag ttgagccaga taaggtagaa gaggccaata aaggagagaa caccagcttg 2880
ttacaccctg tgagcctgca tggaatggat gaccctgaga gagaagtgtt agagtggagg 2940
tttgacagcc gectagcatt tcatcacgtg gcccgagagc tgcattccgga gtacttcaag 3000
aactgcaggc ctatgggtgc gagagcgtca gtattaagcg ggggagaatt agatcgatgg 3060
gaaaaaatc ggttaaggcc agggggaaag aaaaaatata aattaaaaca tatagtatgg 3120
gcaagcaggg agctagaacg attcgcagtt aatcctggcc tgttagaaac atcagaaggc 3180
tgtagacaaa tactgggaca gctacaacca tcccttcaga caggatcaga agaacttaga 3240
tcattatata atacagtagc aaccctctat tgtgtgcatt aaaggataga gataaaagac 3300
accaaggaag ctttagacaa gatagaggaa gagcaaaaca aaagtaagaa aaaagcacag 3360
caagcagcag ctgacacagg acacagcaat caggtcagcc aaaattacta a 3411

```

<210> 10

<211> 1136

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> слитый белок

<400> 10

```

Met Val Ile Val Gln Asn Ile Gln Gly Gln Met Val His Gln Ala Ile
  1          5          10          15
Ser Pro Arg Thr Leu Asn Ala Trp Val Lys Val Val Glu Glu Lys Ala
  20          25          30
Phe Ser Pro Glu Val Ile Pro Met Phe Ser Ala Leu Ser Glu Gly Ala
  35          40          45
Thr Pro Gln Asp Leu Asn Thr Met Leu Asn Thr Val Gly Gly His Gln
  50          55          60
Ala Ala Met Gln Met Leu Lys Glu Thr Ile Asn Glu Glu Ala Ala Glu
  65          70          75          80
Trp Asp Arg Val His Pro Val His Ala Gly Pro Ile Ala Pro Gly Gln
  85          90          95
Met Arg Glu Pro Arg Gly Ser Asp Ile Ala Gly Thr Thr Ser Thr Leu
  100         105         110
Gln Glu Gln Ile Gly Trp Met Thr Asn Asn Pro Pro Ile Pro Val Gly
  115         120         125
Glu Ile Tyr Lys Arg Trp Ile Ile Leu Gly Leu Asn Lys Ile Val Arg
  130         135         140
Met Tyr Ser Pro Thr Ser Ile Leu Asp Ile Arg Gln Gly Pro Lys Glu
  145         150         155         160
Pro Phe Arg Asp Tyr Val Asp Arg Phe Tyr Lys Thr Leu Arg Ala Glu
  165         170         175
Gln Ala Ser Gln Glu Val Lys Asn Trp Met Thr Glu Thr Leu Leu Val
  180         185         190
Gln Asn Ala Asn Pro Asp Cys Lys Thr Ile Leu Lys Ala Leu Gly Pro
  195         200         205
Ala Ala Thr Leu Glu Glu Met Met Thr Ala Cys Gln Gly Val Gly Gly
  210         215         220
Pro Gly His Lys Ala Arg Val Leu His Met Gly Pro Ile Ser Pro Ile
  225         230         235         240
Glu Thr Val Ser Val Lys Leu Lys Pro Gly Met Asp Gly Pro Lys Val
  245         250         255
Lys Gln Trp Pro Leu Thr Glu Glu Lys Ile Lys Ala Leu Val Glu Ile
  260         265         270
Cys Thr Glu Met Glu Lys Glu Gly Lys Ile Ser Lys Ile Gly Pro Glu
  275         280         285
Asn Pro Tyr Asn Thr Pro Val Phe Ala Ile Lys Lys Lys Asp Ser Thr
  290         295         300
Lys Trp Arg Lys Leu Val Asp Phe Arg Glu Leu Asn Lys Arg Thr Gln
  305         310         315         320

```

018201

Asp Phe Trp Glu Val Gln Leu Gly Ile Pro His Pro Ala Gly Leu Lys
 325 330 335
 Lys Lys Lys Ser Val Thr Val Leu Asp Val Gly Asp Ala Tyr Phe Ser
 340 345 350
 Val Pro Leu Asp Glu Asp Phe Arg Lys Tyr Thr Ala Phe Thr Ile Pro
 355 360 365
 Ser Ile Asn Asn Glu Thr Pro Gly Ile Arg Tyr Gln Tyr Asn Val Leu
 370 375 380
 Pro Gln Gly Trp Lys Gly Ser Pro Ala Ile Phe Gln Ser Ser Met Thr
 385 390 395 400
 Lys Ile Leu Glu Pro Phe Arg Lys Gln Asn Pro Asp Ile Val Ile Tyr
 405 410 415
 Gln Tyr Met Asp Asp Leu Tyr Val Gly Ser Asp Leu Glu Ile Gly Gln
 420 425 430
 His Arg Thr Lys Ile Glu Glu Leu Arg Gln His Leu Leu Arg Trp Gly
 435 440 445
 Leu Thr Thr Pro Asp Lys Lys His Gln Lys Glu Pro Pro Phe Leu Lys
 450 455 460
 Met Gly Tyr Glu Leu His Pro Asp Lys Trp Thr Val Gln Pro Ile Val
 465 470 475 480
 Leu Pro Glu Lys Asp Ser Trp Thr Val Asn Asp Ile Gln Lys Leu Val
 485 490 495
 Gly Lys Leu Asn Trp Ala Ser Gln Ile Tyr Pro Gly Ile Lys Val Arg
 500 505 510
 Gln Leu Cys Lys Leu Leu Arg Gly Thr Lys Ala Leu Thr Glu Val Ile
 515 520 525
 Pro Leu Thr Glu Glu Ala Glu Leu Glu Leu Ala Glu Asn Arg Glu Ile
 530 535 540
 Leu Lys Glu Pro Val His Gly Val Tyr Tyr Asp Pro Ser Lys Asp Leu
 545 550 555 560
 Ile Ala Glu Ile Gln Lys Gln Gly Gln Gly Gln Trp Thr Tyr Gln Ile
 565 570 575
 Tyr Gln Glu Pro Phe Lys Asn Leu Lys Thr Gly Lys Tyr Ala Arg Met
 580 585 590
 Arg Gly Ala His Thr Asn Asp Val Lys Gln Leu Thr Glu Ala Val Gln
 595 600 605
 Lys Ile Thr Thr Glu Ser Ile Val Ile Trp Gly Lys Thr Pro Lys Phe
 610 615 620
 Lys Leu Pro Ile Gln Lys Glu Thr Trp Glu Thr Trp Trp Thr Glu Tyr
 625 630 635 640
 Trp Gln Ala Thr Trp Ile Pro Glu Trp Glu Phe Val Asn Thr Pro Pro
 645 650 655
 Leu Val Lys Leu Trp Tyr Gln Leu Glu Lys Glu Pro Ile Val Gly Ala
 660 665 670
 Glu Thr Phe Tyr Val Asp Gly Ala Ala Asn Arg Glu Thr Lys Leu Gly
 675 680 685
 Lys Ala Gly Tyr Val Thr Asn Arg Gly Arg Gln Lys Val Val Thr Leu
 690 695 700
 Thr Asp Thr Thr Asn Gln Lys Thr Glu Leu Gln Ala Ile Tyr Leu Ala
 705 710 715 720
 Leu Gln Asp Ser Gly Leu Glu Val Asn Ile Val Thr Asp Ser Gln Tyr
 725 730 735
 Ala Leu Gly Ile Ile Gln Ala Gln Pro Asp Gln Ser Glu Ser Glu Leu
 740 745 750
 Val Asn Gln Ile Ile Glu Gln Leu Ile Lys Lys Glu Lys Val Tyr Leu
 755 760 765
 Ala Trp Val Pro Ala His Lys Gly Ile Gly Gly Asn Glu Gln Val Asp
 770 775 780
 Lys Leu Val Ser Ala Gly Ile Arg Lys Val Leu Ala Met Gly Gly Lys
 785 790 795 800
 Trp Ser Lys Ser Ser Val Val Gly Trp Pro Thr Val Arg Glu Arg Met
 805 810 815
 Arg Arg Ala Glu Pro Ala Ala Asp Gly Val Gly Ala Ala Ser Arg Asp
 820 825 830

018201

Leu Glu Lys His Gly Ala Ile Thr Ser Ser Asn Thr Ala Ala Thr Asn
835 840 845
Ala Ala Cys Ala Trp Leu Glu Ala Gln Glu Glu Glu Glu Val Gly Phe
850 855 860
Pro Val Thr Pro Gln Val Pro Leu Arg Pro Met Thr Tyr Lys Ala Ala
865 870 875 880
Val Asp Leu Ser His Phe Leu Lys Glu Lys Gly Gly Leu Glu Gly Leu
885 890 895
Ile His Ser Gln Arg Arg Gln Asp Ile Leu Asp Leu Trp Ile Tyr His
900 905 910
Thr Gln Gly Tyr Phe Pro Asp Trp Gln Asn Tyr Thr Pro Gly Pro Gly
915 920 925
Val Arg Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Trp Cys Tyr Lys Leu Val Pro Val
930 935 940
Glu Pro Asp Lys Val Glu Glu Ala Asn Lys Gly Glu Asn Thr Ser Leu
945 950 955 960
Leu His Pro Val Ser Leu His Gly Met Asp Asp Pro Glu Arg Glu Val
965 970 975
Leu Glu Trp Arg Phe Asp Ser Arg Leu Ala Phe His His Val Ala Arg
980 985 990
Glu Leu His Pro Glu Tyr Phe Lys Asn Cys Arg Pro Met Gly Ala Arg
995 1000 1005
Ala Ser Val Leu Ser Gly Gly Glu Leu Asp Arg Trp Glu Lys Ile Arg
1010 1015 1020
Leu Arg Pro Gly Gly Lys Lys Lys Tyr Lys Leu Lys His Ile Val Trp
1025 1030 1035 1040
Ala Ser Arg Glu Leu Glu Arg Phe Ala Val Asn Pro Gly Leu Leu Glu
1045 1050 1055
Thr Ser Glu Gly Cys Arg Gln Ile Leu Gly Gln Leu Gln Pro Ser Leu
1060 1065 1070
Gln Thr Gly Ser Glu Glu Leu Arg Ser Leu Tyr Asn Thr Val Ala Thr
1075 1080 1085
Leu Tyr Cys Val His Gln Arg Ile Glu Ile Lys Asp Thr Lys Glu Ala
1090 1095 1100
Leu Asp Lys Ile Glu Glu Glu Gln Asn Lys Ser Lys Lys Lys Ala Gln
1105 1110 1115 1120
Gln Ala Ala Ala Asp Thr Gly His Ser Asn Gln Val Ser Gln Asn Tyr
1125 1130 1135

<210> 11
<211> 1554
<212> PPT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> слитый белок

<400> 11
Met Ala Ala Arg Ala Ser Ile Leu Ser Gly Gly Lys Leu Asp Ala Trp
1 5 10 15
Glu Lys Ile Arg Leu Arg Pro Gly Gly Lys Lys Tyr Arg Leu Lys
20 25 30
His Leu Val Trp Ala Ser Arg Glu Leu Asp Arg Phe Ala Leu Asn Pro
35 40 45
Ser Leu Leu Glu Thr Thr Glu Gly Cys Gln Gln Ile Met Asn Gln Leu
50 55 60
Gln Pro Ala Val Lys Thr Gly Thr Glu Glu Ile Lys Ser Leu Phe Asn
65 70 75 80
Thr Val Ala Thr Leu Tyr Cys Val His Gln Arg Ile Asp Val Lys Asp
85 90 95
Thr Lys Glu Ala Leu Asp Lys Ile Glu Glu Ile Gln Asn Lys Ser Lys
100 105 110
Gln Lys Thr Gln Gln Ala Ala Ala Asp Thr Gly Asp Ser Ser Lys Val

018201

115 120 125
 Ser Gln Asn Tyr Pro Ile Ile Gln Asn Ala Gln Gly Gln Met Ile His
 130 135 140
 Gln Asn Leu Ser Pro Arg Thr Leu Asn Ala Trp Val Lys Val Ile Glu
 145 150 155 160
 Glu Lys Ala Phe Ser Pro Glu Val Ile Pro Met Phe Ser Ala Leu Ser
 165 170 175
 Glu Gly Ala Thr Pro Gln Asp Leu Asn Val Met Leu Asn Ile Val Gly
 180 185 190
 Gly His Gln Ala Ala Met Gln Met Leu Lys Asp Thr Ile Asn Glu Glu
 195 200 205
 Ala Ala Glu Trp Asp Arg Leu His Pro Val Gln Ala Gly Pro Ile Pro
 210 215 220
 Pro Gly Gln Ile Arg Glu Pro Arg Gly Ser Asp Ile Ala Gly Thr Thr
 225 230 235 240
 Ser Thr Pro Gln Glu Gln Leu Gln Trp Met Thr Gly Asn Pro Pro Ile
 245 250 255
 Pro Val Gly Asn Ile Tyr Lys Arg Trp Ile Ile Leu Gly Leu Asn Lys
 260 265 270
 Ile Val Arg Met Tyr Ser Pro Val Ser Ile Leu Asp Ile Lys Gln Gly
 275 280 285
 Pro Lys Glu Pro Phe Arg Asp Tyr Val Asp Arg Phe Phe Lys Ala Leu
 290 295 300
 Arg Ala Glu Gln Ala Thr Gln Asp Val Lys Gly Trp Met Thr Glu Thr
 305 310 315 320
 Leu Leu Val Gln Asn Ala Asn Pro Asp Cys Lys Ser Ile Leu Lys Ala
 325 330 335
 Leu Gly Ser Gly Ala Thr Leu Glu Glu Met Met Thr Ala Cys Gln Gly
 340 345 350
 Val Gly Gly Pro Gly His Lys Ala Arg Val Leu Ala Glu Ala Met Ser
 355 360 365
 Gln Ala Gln Gln Thr Asn Ile Met Met Gln Arg Gly Asn Phe Arg Gly
 370 375 380
 Gln Lys Arg Ile Lys Cys Phe Asn Cys Gly Lys Glu Gly His Leu Ala
 385 390 395 400
 Arg Asn Cys Arg Ala Pro Arg Lys Lys Gly Cys Trp Lys Cys Gly Lys
 405 410 415
 Glu Gly His Gln Met Lys Asp Cys Thr Glu Arg Gln Ala Asn Phe Leu
 420 425 430
 Gly Lys Ile Trp Pro Ser Ser Lys Gly Arg Pro Gly Asn Phe Pro Gln
 435 440 445
 Ser Arg Pro Glu Pro Thr Ala Pro Pro Ala Glu Leu Phe Gly Met Gly
 450 455 460
 Glu Gly Ile Ala Ser Leu Pro Lys Gln Glu Gln Lys Asp Arg Glu Gln
 465 470 475 480
 Val Pro Pro Leu Val Ser Leu Lys Ser Leu Phe Gly Asn Asp Pro Leu
 485 490 495
 Ser Gln Gly Ser Pro Ile Ser Pro Ile Glu Thr Val Pro Val Thr Leu
 500 505 510
 Lys Pro Gly Met Asp Gly Pro Lys Val Lys Gln Trp Pro Leu Thr Glu
 515 520 525
 Glu Lys Ile Lys Ala Leu Thr Glu Ile Cys Thr Glu Met Glu Lys Glu
 530 535 540
 Gly Lys Ile Ser Lys Ile Gly Pro Glu Asn Pro Tyr Asn Thr Pro Ile
 545 550 555 560
 Phe Ala Ile Lys Lys Lys Asp Ser Thr Lys Trp Arg Lys Leu Val Asp
 565 570 575
 Phe Arg Glu Leu Asn Lys Arg Thr Gln Asp Phe Trp Glu Val Gln Leu
 580 585 590
 Gly Ile Pro His Pro Ala Gly Leu Lys Lys Lys Lys Ser Val Thr Val
 595 600 605
 Leu Asp Val Gly Asp Ala Tyr Phe Ser Val Pro Leu Asp Glu Asn Phe
 610 615 620
 Arg Lys Tyr Thr Ala Phe Thr Ile Pro Ser Thr Asn Asn Glu Thr Pro

018201

1140 1145 1150
 Thr Gly Gln Glu Thr Ala Tyr Phe Leu Leu Lys Leu Ala Gly Arg Trp
 1155 1160 1165
 Pro Val Lys Val Val His Thr Ala Asn Gly Ser Asn Phe Thr Ser Ala
 1170 1175 1180
 Ala Val Lys Ala Ala Cys Trp Trp Ala Asn Ile Gln Gln Glu Phe Gly
 1185 1190 1195 1200
 Ile Pro Tyr Asn Pro Gln Ser Gln Gly Val Val Ala Ser Met Asn Lys
 1205 1210 1215
 Glu Leu Lys Lys Ile Ile Gly Gln Val Arg Asp Gln Ala Glu His Leu
 1220 1225 1230
 Lys Thr Ala Val Gln Met Ala Val Phe Ile His Asn Phe Lys Arg Lys
 1235 1240 1245
 Gly Gly Ile Gly Gly Tyr Ser Ala Gly Glu Arg Ile Ile Asp Ile Ile
 1250 1255 1260
 Ala Thr Asp Ile Gln Thr Lys Glu Leu Gln Lys Gln Ile Thr Lys Ile
 1265 1270 1275 1280
 Gln Asn Phe Arg Val Tyr Tyr Arg Asp Ser Arg Asp Pro Ile Trp Lys
 1285 1290 1295
 Gly Pro Ala Lys Leu Leu Trp Lys Gly Glu Gly Ala Val Val Ile Gln
 1300 1305 1310
 Asp Asn Ser Asp Ile Lys Val Val Pro Arg Arg Lys Ala Lys Ile Leu
 1315 1320 1325
 Arg Asp Tyr Gly Lys Gln Met Ala Gly Asp Asp Cys Val Ala Gly Arg
 1330 1335 1340
 Gln Asp Glu Asp Arg Ser Met Gly Gly Lys Trp Ser Lys Gly Ser Ile
 1345 1350 1355 1360
 Val Gly Trp Pro Glu Ile Arg Glu Arg Met Arg Arg Ala Pro Ala Ala
 1365 1370 1375
 Ala Pro Gly Val Gly Ala Val Ser Gln Asp Leu Asp Lys His Gly Ala
 1380 1385 1390
 Ile Thr Ser Ser Asn Ile Asn Asn Pro Ser Cys Val Trp Leu Glu Ala
 1395 1400 1405
 Gln Glu Glu Glu Val Gly Phe Pro Val Arg Pro Gln Val Pro Leu
 1410 1415 1420
 Arg Pro Met Thr Tyr Lys Gly Ala Phe Asp Leu Ser His Phe Leu Lys
 1425 1430 1435 1440
 Glu Lys Gly Gly Leu Asp Gly Leu Ile Tyr Ser Arg Lys Arg Gln Glu
 1445 1450 1455
 Ile Leu Asp Leu Trp Val Tyr His Thr Gln Gly Tyr Phe Pro Asp Trp
 1460 1465 1470
 Gln Asn Tyr Thr Pro Gly Pro Gly Val Arg Tyr Pro Leu Thr Phe Gly
 1475 1480 1485
 Trp Cys Phe Lys Leu Val Pro Met Glu Pro Asp Glu Val Glu Lys Ala
 1490 1495 1500
 Thr Glu Gly Glu Asn Asn Ser Leu Leu His Pro Ile Cys Gln His Gly
 1505 1510 1515 1520
 Met Asp Asp Glu Glu Arg Glu Val Leu Ile Trp Lys Phe Asp Ser Arg
 1525 1530 1535
 Leu Ala Leu Lys His Arg Ala Gln Glu Leu His Pro Glu Phe Tyr Lys
 1540 1545 1550
 Asp Cys

<210> 12
 <211> 127
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> слитый белок

 <400> 12

018201

Met	Lys	Leu	Lys	Thr	Leu	Ala	Leu	Ser	Leu	Leu	Ala	Ala	Gly	Val	Leu
1				5					10					15	
Ala	Gly	Cys	Ser	Ser	His	Ser	Ser	Asn	Met	Ala	Asn	Thr	Gln	Met	Lys
			20					25					30		
Ser	Asp	Lys	Ile	Ile	Ile	Ala	His	Arg	Gly	Ala	Ser	Gly	Tyr	Leu	Pro
		35					40					45			
Glu	His	Thr	Leu	Glu	Ser	Lys	Ala	Leu	Ala	Phe	Ala	Gln	Gln	Ala	Asp
	50					55				60					
Tyr	Leu	Glu	Gln	Asp	Leu	Ala	Met	Thr	Lys	Asp	Gly	Arg	Leu	Val	Val
65					70					75					80
Ile	His	Asp	His	Phe	Leu	Asp	Gly	Leu	Thr	Asp	Val	Ala	Lys	Lys	Phe
				85					90					95	
Pro	His	Arg	His	Arg	Lys	Asp	Gly	Arg	Tyr	Tyr	Val	Ile	Asp	Phe	Thr
			100					105					110		
Leu	Lys	Glu	Ile	Gln	Ser	Leu	Glu	Met	Thr	Glu	Asn	Phe	Glu	Thr	
		115					120					125			

