

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 201991377 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.01.21

(51) Int. Cl. A61K 39/12 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2018.01.03

(54) КОМПОЗИЦИИ УНИВЕРСАЛЬНОЙ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ГРИППА

(31) 62/441,659

(32) 2017.01.03

(33) US

(86) PCT/GB2018/050004

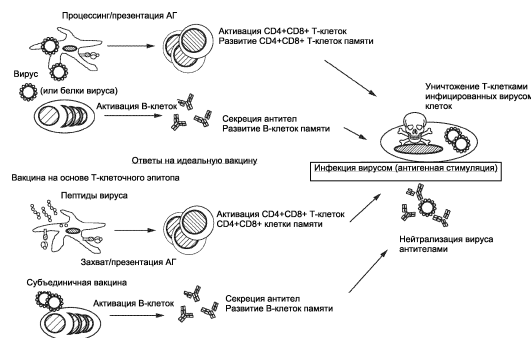
(87) WO 2018/127689 2018.07.12

(71) Заявитель:
ЭМЕРДЖЕКС ВАКСИНС ХОЛДИНГ
ЛИМИТЕД (GB)

(72) Изобретатель:
Филип Рамила (US)

(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(57) В настоящем изобретении предложена композиция вакцины, содержащая пептид вируса гриппа, который содержит CD8+ Т-клеточный эпитоп, и пептид вируса гриппа, который содержит В-клеточный эпитоп, причем каждый пептид присоединен к наночастице.



201991377

A1

A1

201991377

КОМПОЗИЦИИ УНИВЕРСАЛЬНОЙ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ГРИППА

Область техники

Настоящее изобретение относится к вакцинным композициям, содержащим
5 пептиды гриппа, и применению таких композиций для лечения и предотвращения
инфекции вирусом гриппа.

Уровень техники

Грипп представляет собой значительную мировую медицинскую проблему,
10 ежегодно инфицируется более 20% населения Земли, что приводит к более, чем 5
миллионам случаев серьезных заболеваний и >300000 смертей по всему миру.
Согласно оценкам, только в США каждый год с инфекцией гриппом связывают
>30000 смертей и приблизительно 300000 случаев госпитализации. Учитывая
15 недавнее появление нового тяжелого и потенциально рецидивирующего сезонного
заболевания, Всемирная Организация Здравоохранения рекомендует проводить
широкомасштабные кампании по вакцинации, которые снижают частоту
возникновения вызванного гриппом воспаления легких. Для эффективного снижения
частоты возникновения гриппа потребуется непрерывный и интенсивный
20 эпидемиологический надзор, увеличение использования доступных на сегодняшний день
вакцин против гриппа и наличие альтернативных вакцин и противовирусных
лекарственных средств, способных обеспечивать более широкую защиту от штаммов
гриппа с антигенным сдвигом и дрейфом генов. Успешные кампании по вакцинации
против гриппа могут иметь огромное социальное и экономическое значение.

Иммунный ответ на грипп регулируется как врожденным, так и адаптивным
25 иммунитетом. Врожденный иммунный ответ на грипп ограничивает начальную
репликацию вируса, но является относительно неспецифическим. Для эффективного
выведения вируса гриппа требуется устойчивый адаптивный иммунный ответ,
активирующий как гуморальный, так и клеточный иммунитет. Гуморальный
иммунитет, который опосредуется секреторными антителами IgA и IgM,
30 обеспечивает защиту от установления начальной инфекции, тогда как антитела IgG
нейтрализуют вновь реплицирующийся вирус при установившейся инфекции.

Целью стандартных вакцин против гриппа является индукция гуморального иммунитета против вируса гриппа. Однако эти вакцины не являются полностью протективными из-за возникновения антигенных вариаций. Помимо этого считают, что Т-клеточные ответы могут играть ключевую роль в защите от гриппа. CD4⁺ Т-клетки играют важную роль в переключении изотипов на IgG и в продукции антител с более высокой аффинностью и ЦТЛ (цитотоксических лимфоцитов) памяти. У людей гемагглютинин (ГА)-специфичные CD4⁺ Т-клетки пролиферируют после вакцинации против гриппа и способствуют развитию гетеросубтипических ответов антител (гуморального иммунитета) против гриппа. CD8⁺ цитотоксические Т-лимфоциты (ЦТЛ) опосредуют выведение вируса и, как было показано, характеризуются перекрестно-реактивными ответами на различные субтипы вируса гриппа А. Это может объяснить относительную редкость заболевания среди людей старшего поколения, которые ранее получали вакцинацию против гриппа или которые ранее подвергались воздействию гриппа.

Вакцины против гриппа, представленные на сегодняшний день на рынке, ежегодно обновляются. Их разработка основывается на ежегодных рекомендациях ВОЗ относительно штаммов, и их производят до начала сезона гриппа или пандемии. Имеющиеся на сегодняшний день вакцины против гриппа вызывают защитный гуморальный иммунный ответ против гликопротеинов ГА и нейраминидазы (НА) на поверхности вириона. Однако вирусные гликопротеины ГА и НА в большой степени подвержены частому и непредсказуемому антигенному сдвигу и менее частым, но более серьезным мутациям дрейфа генов, которые приводят к отсутствию распознавания антителами. В связи с этим требуется частая разработка новых вакцин, соответствующих актуальному серотипу или серотипам вируса, инфицирующих популяцию людей. Соответственно, существующие вакцины против гриппа являются дорогостоящими в производстве, и маловероятно, что они будут защищать от новых штаммов, которые возникают в межсезонье (например, свиной грипп H1N1 2009 года, H5N1, H7N9). Более того, данные вакцины разработаны для обеспечения защиты на основе антител, и лишь незначительное внимание было уделено индукции Т-клеточных ответов, которые являются важными для устранения инфицированных вирусом клеток из организма.

Несколько четырехвалентных вакцин (защищающих от двух вирусов гриппа А и от двух вирусов гриппа В) были одобрены FDA (Food and Drug Administration, Управлением по контролю качества продуктов питания и лекарственных средств США). Хотя эти вакцины обеспечивают более широкую защиту по сравнению с
5 обычными вакцинами против гриппа, все же маловероятно, что они будут защищать от новых штаммов, которые возникают в межсезонье; также эти вакцины являются дорогостоящими в производстве. Кроме того, как и обычные вакцины против гриппа, четырехвалентные вакцины не позволяют вызывать Т-клеточные ответы, которые важны для устранения инфицированных вирусом клеток из организма.

10 Вследствие этого желательно иметь «универсальную» вакцину против гриппа, обеспечивающую широкую защиту от всех сезонных штаммов гриппа и пандемических штаммов на годы, если не на всю жизнь. Разработка эффективной универсальной вакцины против гриппа уменьшит страх перед будущими пандемиями гриппа и будет более экономически выгодной, чем разработка и производство
15 ежегодных сезонных вакцин против гриппа, как происходит в текущей практике.

Несколько составов универсальных вакцин находятся на стадии разработки. Эти универсальные вакцины можно в общем смысле охарактеризовать по типу защитного иммунного ответа, который они стимулируют: 1) В-клеточные ответы (антитела), 2) Т-клеточные ответы, или 3) как В-, так и Т-клеточные ответы. Kanekiyo
20 с соавторами создали наночастицы ГА (ГА, слитый с ферритином), индуцирующие высокий титр ответов антитела, которые обеспечивают охват множества штаммов гриппа. Клинические исследования данной вакцины еще не начаты. Вакцина на основе Т-клеток, нацеленная на четыре относительно консервативных эпитопа в вирусном геноме, также находится в процессе разработки. Т-клеточную вакцину на
25 основе высококонсервативных CD4-эпитопов оценивали в провокационном исследовании II фазы с положительными защитными ответами против различных штаммов гриппа, включая пандемические штаммы. Рекомбинантная полиэпитопная вакцина, называемая Multimeric-001, которая содержит В-клеточный, CD4 Т-клеточный и CD8 Т-клеточный консервативные эпитопы из девяти различных белков
30 гриппа, исследуется на ранней стадии клинических исследований. Вакцина на основе слитого белка, состоящего из нуклеопротеина (НП) и В-клеточного эпитопа M2e,

связанных с адъювантом и пептидом M2e в наночастице золота, в комбинации с CpG, также находится на стадии разработки. Большинство из упомянутых выше вакцин применяют совместно с различными адъювантами, которые часто вызывают побочные эффекты при клиническом применении.

5

Краткое описание изобретения

Настоящее изобретение относится к композиции вакцины против гриппа, которая стимулирует иммунный ответ, одновременно позволяя избежать побочных клинических эффектов, часто связанных с вакцинами, содержащими адъювант. В
10 одном аспекте композиция вакцины стимулирует как продукцию антител, специфичных к вирусу гриппа, так и Т-клеточный ответ против вируса гриппа. Стимуляция как гуморальных, так и клеточных ответов позволяет вакцине имитировать иммунный ответ на природную вирусную инфекцию (фигура 1). Композиция вакцины может обеспечить защиту как от сезонных, так и от
15 пандемических штаммов гриппа, например, композиция вакцины может представлять собой универсальную вакцину.

Авторы настоящего изобретения неожиданно обнаружили, что наночастицу, например, наночастицу золота, можно применять для индукции эффективного ответа на композицию вакцины, разработанную для стимуляции как продукции антител,
20 специфичных к вирусу гриппа, так и Т-клеточного ответа против вируса гриппа. Применение наночастицы устраняет необходимость добавлять в композицию вакцины традиционный адъювант. Это позволяет снизить вероятность нежелательных реакций у индивидуума после введения композиции вакцины.

Авторы настоящего изобретения также идентифицировали множество консервативных пептидов, которые являются консервативными у различных вирусов гриппа и презентуются молекулами ГКГС на клетках, инфицированных данными вирусами. Включение в композицию вакцины таких консервативных пептидов может обеспечивать защитную способность против как сезонных, так и пандемических штаммов гриппа. Включение в композицию вакцины множества консервативных
25 пептидов, которые связываются с различными супертипами HLA, приводит к
30

получению вакцины, которая является эффективной у индивидуумов с различными типами HLA.

Соответственно, в настоящем изобретении предложена композиция вакцины, содержащая один или более иммуногенных пептидов вируса гриппа, присоединенных к наночастице.

В настоящем изобретении также предложены:

- композиция вакцины, содержащая пептид вируса гриппа, который содержит CD8+ Т-клеточный эпитоп, и пептид вируса гриппа, который содержит В-клеточный эпитоп, причем каждый пептид присоединен к наночастице;
- композиция вакцины, содержащая пептид вируса гриппа, который содержит один или более CD8+ Т-клеточных эпитопов, представленных в SEQ ID NO: 1 – 18, причем пептид присоединен к наночастице;
- способ предотвращения или лечения инфекции вирусом гриппа, включающий введение композиции вакцины согласно настоящему изобретению индивидууму, инфицированному или подверженному риску инфицирования вирусом гриппа; и
- композиция вакцины согласно настоящему изобретению для применения в способе предотвращения или лечения инфекции вирусом гриппа у индивидуума.

Краткое описание фигур

Фигура 1: Вакцина для имитации адаптивного иммунного ответа, вызываемого вирусной инфекцией.

Фигура 2: Подтверждение грипп-специфичных пептидных последовательностей.

Фигура 3: ЦТЛ, специфичные к эпитопам (P1-P5), полученные *in vitro* с применением МКПК (моноклеарных клеток периферической крови) человека, распознают как нагруженные пептидом (изображение А), так и инфицированные различными вирусами гриппа (изображение В) клетки-мишени.

Фигура 4: ЦТЛ, специфичные к эпитопам (P1-P5), полученные *in vivo* в трансгенных мышях HLA A2, распознают как нагруженные пептидом (изображение

В), так и инфицированные различными вирусами гриппа (изображение С) клетки-мишени.

Фигура 5: Эпитопы, встроенные в НЧ (наночастицы, НЧ 1-5), активируют специфичные к различным вирусам гриппа ЦТЛ в трансгенных мышцах HLA A2. Изображение А и В: ELISpot (метод иммуноферментных пятен); Изображение С: экспрессия CD107.

Фигура 6: Иммунизация пептидом M2e + адьювантом (Пеп. 6) или в НЧ (НЧ 6) индуцирует специфичный ответ антител (изображение А). На свободный пептид без адьюванта ответ антител отсутствует (изображение В).

Фигура 7: Антисыворотка, специфичная к пептиду M2e, связывается с эпитопом M2e на клетках, инфицированных вирусом гриппа (PR8, X-31 или JAP (зеленый, голубой, красный, соответственно).

Фигура 8: Фигура 8: Нейтрализация инфекции, опосредованная антителами против M2e. Сыворотка, использованная на верхних изображениях, была выделена от мышей, иммунизированных пептидом, на нижний изображения – от мышей, иммунизированных НЧ.

Фигура 9: Встречающийся в природе ответ антител против M2e у здоровых индивидуумов, которые подвергались воздействию вируса гриппа.

Фигура 10: Обнаружение заранее существующих эпитоп-специфичных ЦТЛ с помощью анализа МКПК от сероположительных к лихорадке денге индивидуумов на основе декстрамера.

Фигура 11: Фигура 11: Эпитоп-специфичные ЦТЛ у сероположительных индивидуумов распознают нагруженные пептидом (Пеп.) и инфицированные вирусом лихорадки денге (DV2) клетки-мишени.

Фигура 12: CD8-эпитопы, встроенные в более длинные пептиды, процессируются и презентуются на АПК (антигенпрезентирующих клетках). Верхнее изображение, комплексы SIIN:Kb, обнаруженные с помощью проточной цитометрии. Нижнее изображение, SIIN-специфичная активация Т-клеток в анализе гибридомы.

Подробное описание изобретения

Вакцинные композиции, стимулирующие гуморальные и клеточные ответы

В настоящем изобретении предложена композиция вакцины, содержащая один или более иммуногенных пептидов вируса гриппа, присоединенных к наночастице. В частности, композиция вакцины содержит пептид вируса гриппа, который содержит CD8+ Т-клеточный эпитоп, и пептид вируса гриппа, который содержит В-клеточный эпитоп, причем каждый пептид присоединен к наночастице.

Эта композиция вакцины характеризуется множеством преимуществ по сравнению с обычными вакцинами против гриппа, известными в данной области техники. Ключевые преимущества обобщены в настоящем документе. Однако другие преимущества будут очевидны из приведенного ниже обсуждения.

Во-первых, композиция вакцины согласно настоящему изобретению в качестве преимущества содержит пептид вируса гриппа, который содержит CD8+ Т-клеточный эпитоп, и пептид вируса гриппа, который содержит В-клеточный эпитоп. Вследствие этого композиция вакцины способна стимулировать как клеточные, так и гуморальные иммунные ответы на вирус гриппа. Как описано выше, гуморальные иммунные ответы обеспечивают первую линию защиты от инфекции вирусом гриппа. В частности, секреторные антитела IgA и IgM защищают от установления начальной инфекции вирусом гриппа, например, путем предотвращения присоединения вируса к эпителиальным клеткам на слизистых поверхностях. Затем во время установившейся инфекции антитела IgG нейтрализуют вновь реплицирующийся вирус, чтобы помочь минимизировать размножение вируса. Вследствие этого гуморальные ответы играют важную роль в предотвращении и лечении инфекции вирусом гриппа. Однако клеточные ответы, в особенности, Т-клеточные ответы, также важны. CD4+ Т-клетки контролируют переключение изотипов на IgG и, вследствие этого, нейтрализацию реплицирующегося вируса. CD4+ Т-клетки также способствуют продукции антител с более высокой аффинностью и цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ) памяти. CD8+ ЦТЛ сами по себе опосредуют выведение вируса благодаря своей цитотоксической активности в отношении инфицированных клеток. Вследствие этого стимуляция как гуморального, так и клеточного иммунитета обеспечивает выгодную двунаправленную атаку против инфекции вирусом гриппа.

Во-вторых, каждый пептид вируса гриппа в композиции вакцины присоединен к наночастице, например, наночастице золота. Как более подробно описано ниже, присоединение к наночастице снижает или устраняет необходимость добавлять в композицию вакцины адъювант. Таким образом, композиция вакцины с меньшей
5 вероятностью вызовет побочные клинические эффекты после введения индивидууму.

Пептиды вируса гриппа

Композиция вакцины согласно настоящему изобретению содержит один или более иммуногенных пептидов вируса гриппа. Композиция вакцины может содержать
10 от приблизительно одного до приблизительно 50 пептидов вируса гриппа, например, приблизительно от 2 до 40, от 30 до 30, от 4 до 25, от 5 до 20, от 6 до 15, 7, 8, 9 или 10 пептидов вируса гриппа. Каждый пептид содержит один или более эпитопов, которые могут представлять собой CD8⁺ Т-клеточный эпитоп, CD4⁺ Т-клеточный эпитоп и/или В-клеточный эпитоп.

В одном аспекте композиция вакцины содержит пептид вируса гриппа, который содержит CD8⁺ Т-клеточный эпитоп, и пептид вируса гриппа, который содержит В-клеточный эпитоп.
15

Пептид вируса гриппа представляет собой пептид, который экспрессируется одним или несколькими вирусами гриппа. Вирусы гриппа являются хорошо
20 известными членами семейства Orthomyxoviridae. Существуют сотни штаммов вируса гриппа, которые можно классифицировать на три основные категории, грипп А, грипп В или грипп С, в зависимости от белков ГА и НА, которые они экспрессируют. Композиция вакцины может содержать пептиды вируса гриппа из множества штаммов гриппа, например, от 1 до 2000, от 100 до 1900, от 200 до 1800, от 300 до
25 1700, от 400 до 1600, от 500 до 1500, от 600 до 1400, от 700 до 1300, от 800 до 1200 или от 900 до 1100 штаммов гриппа. Например, композиция вакцины может содержать один или более пептидов вируса гриппа из гриппа А, гриппа В и/или гриппа С. Таким образом, пептид вируса гриппа, который содержит CD8⁺ Т-клеточный эпитоп, может представлять собой пептид, который экспрессируется вирусом гриппа
30 А, гриппа В и/или гриппа С. Пептид вируса гриппа, который содержит В-клеточный эпитоп, может представлять собой пептид, который экспрессируется вирусом гриппа

А, гриппа В и/или гриппа С. Пептид вируса гриппа, который содержит CD8+ Т-клеточный эпитоп, и пептид вируса гриппа, который содержит В-клеточный эпитоп, могут представлять собой пептиды, которые экспрессируются одним и тем же штаммом гриппа, таким как грипп А, грипп В или грипп С. В качестве альтернативы, пептид вируса гриппа, который содержит CD8+ Т-клеточный эпитоп, и пептид вируса гриппа, который содержит В-клеточный эпитоп, могут представлять собой пептиды, которые экспрессируются различными штаммами гриппа.

Если пептид вируса гриппа представляет собой пептид, который экспрессируется вирусом гриппа А, вирус гриппа А может представлять собой, например, H1N1, H5N1, H7N9 или H3N2. В предпочтительном варианте пептид вируса гриппа экспрессируется двумя или более вирусами гриппа А H1N1, H5N1, H7N9 и H3N2, такими как, например, H1N1 и H3N2. Пептид вируса гриппа может представлять собой пептид, который экспрессируется вирусом гриппа человека, вирусом гриппа свиней и/или вирусом гриппа птиц. Вирус гриппа может представлять собой пандемический вирус гриппа или потенциально пандемический вирус гриппа. Вирус гриппа может представлять собой зоонозный вирус гриппа.

Пептид вируса гриппа может представлять собой пептид, который экспрессируется на поверхности одного или нескольких вирусов гриппа, или внутриклеточно в одном или нескольких вирусах гриппа. Пептид может представлять собой структурный пептид или функциональный пептид, такой как пептид, участвующий в метаболизме или репликации вируса гриппа. В предпочтительном варианте пептид представляет собой внутренний пептид. В предпочтительном варианте пептид является консервативным среди двух или более различных штаммов гриппа.

Пептид вируса гриппа может содержать любое число аминокислот, т.е. его длина может быть любой. Как правило, пептид вируса гриппа составляет от приблизительно 8 до приблизительно 30, 35 или 40 аминокислот в длину, например, от приблизительно 9 до приблизительно 29, от приблизительно 10 до приблизительно 28, от приблизительно 11 до приблизительно 27, от приблизительно 12 до приблизительно 26, от приблизительно 13 до приблизительно 25, от приблизительно 13 до приблизительно 24, от приблизительно 14 до приблизительно 23, от

приблизительно 15 до приблизительно 22, от приблизительно 16 до приблизительно 21, от приблизительно 17 до приблизительно 20 или от приблизительно 18 до приблизительно 29 аминокислот в длину.

5 Пептид вируса гриппа может быть получен химическим способом из полипептида антигена вируса гриппа, например, путем протеолитического расщепления. Более часто пептид вируса гриппа может быть синтезирован с помощью способов, хорошо известных в данной области техники.

10 Термин «пептид» включает не только молекулы, в которых аминокислотные остатки связаны пептидными (-CO-NH-) связями, но также молекулы, в которых пептидная связь реверсирована. Такие ретро-инверсированные пептидомиметики можно получить с применением способов, известных в данной области техники, например, таких как способы, описанные в публикации Meziere et al (1997) J. Immunol.159, 3230-3237. Этот подход включает получение псевдопептидов, содержащих изменения, затрагивающие остов, но не ориентацию боковых цепей. 15 Meziere с соавторами (1997) продемонстрировали, что данные псевдопептиды подходят по меньшей мере для ГКГС класса II и ответов клеток Т-хелперов. Ретро-инверсированные пептиды, которые содержат связи NH-CO вместо пептидных связей CO-NH, являются в значительной степени более устойчивыми к протеолизу.

Аналогично, можно обойтись совсем без пептидной связи при условии, что 20 применяют соответствующий линкерный фрагмент, который обеспечивает расстояние между атомами углерода аминокислотных остатков; данный подход является особенно предпочтительным, если линкерный фрагмент характеризуется по существу таким же распределением заряда и по существу такой же планарностью, что и пептидная связь. Также понятно, что пептид может быть обычным способом 25 заблокирован на N- или C-конце так, чтобы способствовать снижению восприимчивости к экзопроотеолитическому расщеплению. Например, N-концевую аминогруппу пептидов можно защитить путем осуществления реакции с карбоновой кислотой, а C-концевую карбоксильную группу пептида можно защитить путем осуществления реакции с амином. Другие примеры модификаций включают 30 гликозилирование и фосфорилирование. Другой потенциальной модификацией является то, что водороды на аминах боковых цепей R или K можно заменить

метиленовыми группами (-NH₂ можно модифицировать с получением -NH(Me) или -N(Me)₂).

Термин «пептид» также включает варианты пептидов, которые увеличивают или уменьшают период полужизни пептида *in vivo*. Примеры аналогов, способных
5 увеличивать период полужизни пептидов, применяемых согласно настоящему изобретению, включают пептоидные аналоги пептидов, производные пептидов на основе D-аминокислот и гибриды пептид-пептоид. Следующий вариант реализации варианта полипептидов, применяемых согласно настоящему изобретению, включает
10 формы полипептида на основе D-аминокислот. Получение полипептидов с применением D-аминокислот вместо L-аминокислот в значительной степени снижает нежелательное расщепление такого средства нормальными метаболическими процессами, что позволяет снизить количества средства, которое необходимо ввести, а также частоту его введения.

15 CD8+ T-клеточные эпитопы

Композиция вакцины согласно настоящему изобретению предпочтительно содержит пептид вируса гриппа, который содержит CD8+ T-клеточный эпитоп. CD8+ T-клеточный эпитоп представляет собой пептид, способный (i) быть презентированным молекулой ГКГС класса I и (ii) распознаваться T-клеточным
20 рецептором (ТКР), присутствующим на CD8+ T-клетке. В предпочтительном варианте распознавание ТКР приводит к активации CD8+ T-клетки. Активация CD8+ T-клетки может привести к увеличению пролиферации, продукции цитокинов и/или цитотоксических эффектов.

Как правило, длина CD8+ T-клеточного эпитопа составляет приблизительно 9
25 аминокислот, хотя CD8+ T-клеточный эпитоп может быть более коротким или длинным. Например, CD8+ T-клеточный эпитоп может составлять приблизительно 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 аминокислот в длину. CD8+ T-клеточный эпитоп может составлять приблизительно от 8 до 15, от 9 до 14 или от 10 до 12 аминокислот в длину.

Пептиды вируса гриппа, которые содержат CD8+ T-клеточный эпитоп,
30 известны в данной области техники. Способы идентификации CD8+ T-клеточных эпитопов известны в данной области техники. Способы картирования эпитопов

включают рентгеновскую со-кристаллографию, олигопептидное сканирование на основе матриц (иногда называемое перекрывающимся пептидным сканированием или анализом Pepscan), сайт-направленный мутагенез, высокоэффективное картирование на основе мутагенеза, обмен водород-дейтерий, масс-спектрометрию с поперечно-сшитым сочетанием, фаговый дисплей и ограниченный протеолиз. Также можно
5 применять методики предсказания мотива ГКГС.

В предпочтительном варианте CD8⁺ Т-клеточные эпитопы, презентруемые инфицированными вирусом гриппа клетками, можно идентифицировать, чтобы
напрямую идентифицировать CD8⁺ Т-клеточные эпитопы для включения в
10 композицию вакцины. Данный подход представляет собой эффективный и логичный способ, который можно применять отдельно или для подтверждения пригодности потенциальных CD8⁺ Т-клеточных эпитопов, идентифицированных с помощью методик предсказания мотива ГКГС. Для осуществления данного способа клетки инфицируют вирусом гриппа и поддерживают в культуре в течение периода времени
15 приблизительно 24 часа. Затем клетки собирают и промывают. После этого клетки лизируют, и выделяют комплексы ГКГС/пептид методом иммуноаффинной хроматографии с помощью антител, специфичных к молекуле ГКГС. Пептиды, очищенные из молекул ГКГС, разделяют на фракции, например, с применением колонки C-18 с обращенной фазой (ОФ) методом ВЭЖХ в режиме «офлайн».
20 Содержащие пептид фракции собирают, высушивают под вакуумом и исследуют методом масс-спектрометрии для идентификации последовательностей фракций. Затем проводят поиск для полученных спектральных данных во всех базах данных белков гриппа для идентификации пептидных последовательностей, связанных с вирусом гриппа. После этого на основании идентифицированных
25 последовательностей можно получить синтетические пептиды и провести их анализ методом масс-спектрометрии для подтверждения их идентичности пептидам в содержащих пептид фракциях.

В данном способе вирусом гриппа можно инфицировать любой тип клеток. Клетки могут представлять собой антигенпрезентирующие клетки. Клетки могут
30 представлять собой клетки гепатомы, такие как клетки HepG2, трансформированные

ВЭБ (вирусом Эпштейна-Барр) лимфобластоидные В-клетки, такие как клетки JY, или лимфобласты, такие как клетки T2.

Аналогично, можно применять любой вирус гриппа, представляющий интерес, чтобы инфицировать клетки. Например, вирус гриппа может представлять собой вирус гриппа А, гриппа В или гриппа С. Вирус гриппа А может, например, представлять собой H1N1, H5N1, H7N9 или H3N2.

Прямая идентификация CD8⁺ Т-клеточных эпитопов, презантируемых клетками, инфицированными вирусом гриппа, характеризуется преимуществом по сравнению с методиками предсказания мотива ГКГС. База данных иммунных эпитопов (IEDB; <http://www.iedb.org>) создана способами предсказания мотива, а не функциональными способами, и содержит более сотен предсказанных HLA-специфичных Т-клеточных эпитопов гриппа, включая множество общих эпитопов с высокими показателями связывания ГКГС и ограниченными характеристиками ЦТЛ. Поскольку клетками, инфицированными вирусом гриппа, презентуются как доминантные, так и субдоминантные эпитопы, сложно отсортировать иерархию доминантности эпитопов, презантируемых в природе, с применением базы данных. Таким образом, из базы данных иммунных эпитопов самой по себе не очевидно, какие из перечисленных эпитопов, как можно ожидать, будут эффективно индуцировать CD8⁺ Т-клеточный ответ при включении в композицию вакцины. Способ прямой идентификации, изложенный выше, обеспечивает механизм подтверждения пригодности эпитопов.

Кроме того, способ прямой идентификации можно применять для идентификации консервативных CD8⁺ Т-клеточных эпитопов, презантируемых клетками, инфицированными различными вирусами гриппа. Таким способом можно идентифицировать CD8⁺ Т-клеточные эпитопы, подходящие для включения в универсальную вакцину. Как изложено в примерах, авторы настоящего изобретения применяли способ прямой идентификации для идентификации CD8⁺ Т-клеточных эпитопов, консервативных среди штаммов гриппа А (H1N1 и H3N2) и гриппа В. Идентифицированные последовательности представлены в таблице 1.

Таблица 1

SEQ ID NO:	Пептид	Белок	Мотив HLA
1	PVAGGTSSIYI (P2)	полимераза PB2	A2
2	TVIKTNMI (P3)	полимераза PB1	A2/A24
3	MTIIFLILM (P4)	гемагглютинин	A2/A24
4	ITFHGAKEI	Матриксный белок 1	A2/A24
5	AINGITNKV	Гемагглютинин	A2/A24
6	EEMGITTHF	Каталитическая субъединица РНК-направляемой РНК-полимеразы	B44
7	VETPIRNEW	Матриксный белок 2	B44
8	REILTKTTV	Щелочной белок полимеразы 2	B44
9	KESDEALNMTMASTP	Неструктурный белок NS1	B44
10	LENERTLDF	Кислый белок полимеразы	B44
11	MEAVPLITI	Гемагглютинин	B44
12	VEQEIRTF	Белок ядерного экспорта	B44
13	VEQELRTF	неструктурный белок 2	B44
14	SPDDFALIVNA	полимераза PB1	B7
15	YPDTGKVM	Нейраминидаза	B7
16	YPDASKVM	нейраминидаза	B7
17	QPETCNQSI	Нейраминидаза	B7
18	VPESKRMSL	неструктурный белок (NS1)	B7

Авторы настоящего изобретения также подтвердили, что известные пептиды YINTALLNA (P1; SEQ ID NO: 19), AIMDKNIIL (P5; SEQ ID NO: 20) и LPFDRTTIM (SEQ ID NO: 21) представляют собой CD8⁺ Т-клеточные эпитопы, консервативные среди штаммов гриппа А (H1N1 и H3N2) и гриппа В.

Вследствие этого пептид вируса гриппа, который содержит CD8⁺ Т-клеточный эпитоп, может содержать одну или более из SEQ ID NO: 1 – 21. Например, пептид вируса гриппа, который содержит CD8⁺ Т-клеточный эпитоп, может содержать две или более, три или более, четыре или более, пять или более, десять или более, пятнадцать или более или двадцать или более из SEQ ID NO: 1 – 21 в любой комбинации. Пептид вируса гриппа, который содержит CD8⁺ Т-клеточный эпитоп, может содержать все из SEQ ID NO: 1 – 21.

Аналогично, композиция вакцины может содержать один или более пептидов вируса гриппа, каждый из которых содержит CD8⁺ Т-клеточный эпитоп, который содержит отличную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1 – 21. Например, композиция вакцины может содержать два или более, три или более, четыре или

более, пять или более, десять или более, пятнадцать или более или двадцать или более пептидов вируса гриппа, каждый из которых содержит CD8⁺ Т-клеточный эпитоп, содержащий отличную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1 – 21, в любой комбинации. Композиция вакцины может, например, содержать 21 пептид
5 вируса гриппа, каждый из которых содержит CD8⁺ Т-клеточный эпитоп, содержащий отличную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1 - 21.

В-клеточные эпитопы

Композиция вакцины согласно настоящему изобретению может содержать
10 пептид вируса гриппа, который содержит В-клеточный эпитоп. В-клеточный эпитоп представляет собой пептид, способный к распознаванию В-клеточным рецептором (ВКР), присутствующим на В-клетке. В предпочтительном варианте распознавание ВКР приводит к активации и/или созреванию В-клетки. Активация В-клетки может привести к увеличению пролиферации и/или продукции антитела.

15 Пептиды вируса гриппа, которые содержат В-клеточный эпитоп, известны в данной области техники. В-клеточный эпитоп может представлять собой линейный эпитоп, т.е. эпитоп, который определяется первичной аминокислотной последовательностью конкретной области белка вируса гриппа. В качестве альтернативы, эпитоп может представлять собой конформационный эпитоп, т.е.
20 эпитоп, который определяется конформационной структурой нативного белка гриппа. В данном случае эпитоп может быть непрерывным (т.е. компоненты, которые взаимодействуют с антителом, расположены на белке последовательно рядом друг с другом) или прерывистым (т.е. компоненты, которые взаимодействуют с антителом, расположены на различных частях белка, которые сближаются друг с другом в
25 свернутой нативной структуре белка).

Как правило, В-клеточный эпитоп составляет приблизительно от 5 до 20 аминокислот в длину, например, от 6 до 19, от 7 до 18, от 8 до 17, от 9 до 16, от 10 до 15, от 11 до 14 или от 12 до 13 аминокислот в длину.

30 Способы идентификации В-клеточных эпитопов также известны в данной области техники. Например, для идентификации В-клеточных эпитопов можно применять способы картирования эпитопов. Данные способы включают структурные

подходы, в которых известную или смоделированную структуру белка используют в подходе на основе алгоритма для предсказания эпитопов поверхности, и функциональные подходы, в которых связывание целых белков, фрагментов белков или пептидов с антителом можно количественно определить, например, с
5 применением твердофазного иммуноферментного анализа (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA). Также можно применять способы конкурентного картирования, модификации антигена или фрагментации белка.

В-клеточный эпитоп может, например, представлять собой эпитоп матричного белка гриппа 2 (M2e). Внеклеточный домен белка M2e является
10 эволюционно консервативной областью в вирусах гриппа А. Таким образом, включение в композицию вакцины пептида гриппа, который содержит В-клеточный эпитоп M2e, может способствовать обеспечению свойства универсальности.

Композиции универсальной вакцины

15 В настоящем изобретении также предложена композиция вакцины, содержащая пептид вируса гриппа, который содержит один или более CD8+ Т-клеточных эпитопов, представленных в SEQ ID NO: 1 - 21, причем пептид присоединен к наночастице.

Включение в композицию вакцины пептида вируса гриппа, содержащего один
20 или более CD8+ Т-клеточных эпитопов, представленных в SEQ ID NO: 1 – 21, обеспечивает преимущество. Как изложено выше, CD8+ Т-клеточные эпитопы, представленные в SEQ ID NO: 1 – 21, являются консервативными CD8+ Т-клеточными эпитопами, которые презентуются молекулами ГКГС на клетках, инфицированных различными вирусами гриппа. Соответственно, иммунный ответ,
25 образованный в результате вакцинации композицией, которая содержит любой из данных эпитопов, защитит от последующей инфекции любым вирусом гриппа, который содержит данный эпитоп. Другими словами, композиция вакцины характеризуется «встроенной» перекрестной эффективностью в отношении разных субтипов, т.е. она представляет собой универсальную композицию вакцины против
30 гриппа. Такая композиция может предотвратить значительное распространение внезапно возникшего или повторно возникшего штамма гриппозной инфекции.

Кроме того, вакцинные композиции на основе эпитопов, презантируемых клетками, инфицированными вирусом гриппа, такие как композиция вакцины согласно настоящему изобретению, превосходят вакцины на основе субъединиц вирусного белка или эпитопа с предсказанным мотивом. Процессинг белка иммунной системой, вероятно, изменяет нативные вирусные эпитопы. Композиция вакцины на основе пептидов, которые, как было продемонстрировано, презентуются инфицированными клетками, устраняет данный источник неопределенности, поскольку пептиды уже подверглись процессингу белка.

Присоединение пептида вируса гриппа к наночастице, например, наночастице золота, также обеспечивает преимущество. Как описано более подробно ниже, присоединение к наночастице снижает или устраняет необходимость добавлять в композицию вакцины адъювант. Таким образом, композиция вакцины после введения индивидууму с меньшей вероятностью вызовет побочные клинические эффекты.

15 *Пептиды гриппа, содержащие SEQ ID NO: 1 - 21*

Композиция вакцины содержит пептид вируса гриппа, содержащий один или более CD8⁺ Т-клеточных эпитопов, представленных в SEQ ID NO: 1 - 21. Пептиды вируса гриппа, содержащие SEQ ID NO: 1 – 21, подробно описаны выше применительно к вакцинным композициям, стимулирующим гуморальные и клеточные ответы. Пептид вируса гриппа может содержать два или более, например, три или более, четыре или более, пять или более, десять или более, пятнадцать или более или 20 или более из CD8⁺ Т-клеточных эпитопов, представленных в SEQ ID NO: 1 - 21. В данном случае пептид вируса гриппа может содержать любую комбинацию CD8⁺ Т-клеточных эпитопов, представленных в SEQ ID NO: 1 - 21. Пептид вируса гриппа может содержать все из CD8⁺ Т-клеточных эпитопов, представленных в SEQ ID NO: 1 - 21.

Композиция вакцины может содержать два или более пептидов вируса гриппа, причем все они содержат разные CD8⁺ Т-клеточные эпитопы. Все из двух или более пептидов может содержать разные CD8⁺ Т-клеточные эпитопы, представленные в SEQ ID NO: 1 - 21. В качестве альтернативы, один или более двух или более пептидов

может содержать CD8+ Т-клеточный эпитоп, который не представлен в SEQ ID NO: 1 - 21. CD8+ Т-клеточные эпитопы известны в данной области техники.

Наночастицы

- 5 Как в композиции вакцины, содержащей пептид вируса гриппа, который содержит CD8+ Т-клеточный эпитоп, и пептид вируса гриппа, который содержит В-клеточный эпитоп, так и в композиции вакцины, содержащей пептид вируса гриппа, содержащий один или более CD8+ Т-клеточных эпитопов, представленных в SEQ ID NO: 1 - 21, каждый из пептидов вируса гриппа присоединен к наночастице.
- 10 Как изложено выше и продемонстрировано в примерах ниже, присоединение пептидов вируса гриппа к наночастице (такой как наночастица золота) снижает или устраняет необходимость добавлять в композицию вакцины адъювант. Наночастицы могут содержать иммунные «сигналы опасности», которые помогают эффективно индуцировать иммунный ответ на пептиды вируса гриппа. Наночастицы могут
- 15 вызывать активацию и созревание дендритных клеток (ДК), необходимых для устойчивого иммунного ответа. Наночастицы могут содержать чужеродные компоненты, улучшающие захват наночастиц и, таким образом, пептидов вируса гриппа клетками, такими как антигенпрезентирующие клетки. Вследствие этого присоединение пептида вируса гриппа к наночастице может усиливать способность
- 20 антигенпрезентирующих клеток стимулировать вирус-специфичные В- и/или Т-клетки. Присоединение к наночастице также способствует доставке вакцинных композиций подкожным, внутридермальным, трансдермальным и пероральным/буккальным путями, обеспечивая более широкие возможности при введении, чем в случае обычных вакцин против гриппа.
- 25 Наночастицы представляют собой частицы размером от 1 до 100 нанометров (нм), которые можно использовать в качестве субстрата для иммобилизации лигандов. В вакцинных композициях согласно настоящему изобретению наночастица может характеризоваться средним диаметром от 1 до 100, от 20 до 90, от 30 до 80, от 40 до 70 или от 50 до 60 нм. В предпочтительном варианте наночастица характеризуется
- 30 средним диаметром от 20 до 40 нм. Средний диаметр от 20 до 40 нм способствует захвату наночастицы в цитозоль. Средний диаметр можно измерять с применением

методик, хорошо известных в данной области техники, таких как трансмиссионная электронная микроскопия.

Наночастицы, подходящие для доставки антигена, такого как пептид вируса гриппа, известны в данной области техники. Способы получения таких наночастиц также известны.

Наночастица может, например, представлять собой полимерную наночастицу, неорганическую наночастицу, липосому, иммуностимулирующий комплекс (immune stimulating complex, ISCOM), вирусоподобную частицу (ВПЧ) или самособирающийся белок. Наночастица, в предпочтительном варианте, представляет собой наночастицу фосфата кальция, наночастицу кремния или наночастицу золота.

Наночастица может представлять собой полимерную наночастицу. Полимерная наночастица может содержать один или более синтетических полимеров, таких как поли(d,l-лактид-ко-гликолид) (PLG), поли(d,l-молочная-ко-гликолевая кислота) (PLGA), поли(g-глутаминовая кислота) (g-PGA) и поли(этиленгликоль) (PEG) или полистирол. Полимерная наночастица может содержать один или более природных полимеров, таких как полисахарид, например, пуллулан, альгинат, инулин и хитозан. Применение полимерной наночастицы может характеризоваться преимуществом благодаря свойствам полимеров, которые могут быть включены в наночастицу. Например, природные и синтетические полимеры, указанные выше, могут характеризоваться хорошей биологической совместимостью и способностью к биологическому разложению, нетоксичной природой и/или способностью принимать желаемые формы и размеры. Полимерная наночастица может образовывать гидрогелевую наночастицу. Гидрогелевые наночастицы представляют собой тип наноразмерной гидрофильной трехмерной полимерной сети. Гидрогелевые наночастицы обладают благоприятными свойствами, включая адаптируемый размер ячеек, большую площадь поверхности для поливалентной конъюгации, высокое содержание воды и высокую емкость загрузки антигенов. Полимеры, такие как поли(L-молочная кислота) (PLA), PLGA, ПЭГ и полисахариды, являются особенно подходящими для получения гидрогелевых наночастиц.

Наночастица может представлять собой неорганическую наночастицу. Как правило, неорганические наночастицы обладают жесткой структурой и не

подвергаются биологическому разложению. Однако неорганическая наночастица может подвергаться биологическому разложению. Неорганическая наночастица может содержать оболочку, в которую может быть инкапсулирован антиген. Неорганическая наночастица может содержать сердцевину, к которой может быть

5 ковалентно присоединен антиген. Сердцевина может содержать металл. Например, сердцевина может содержать атомы золота (Au), серебра (Ag) или меди (Cu). Сердцевина может быть образована более чем одним типом атомов. Например, сердцевина может содержать сплав, такой как сплав Au/Ag, Au/Cu, Au/Ag/Cu, Au/Pt, Au/Pd или Au/Ag/Cu/Pd. Сердцевина может содержать фосфат кальция (CaP).

10 Сердцевина может содержать полупроводниковый материал, например, селенид кадмия.

Другие примеры неорганических наночастиц включают наночастицы углерода и наночастицы на основе диоксида кремния. Наночастицы углерода характеризуются хорошей биологической совместимостью, и их можно синтезировать в нанотрубках и

15 мезопористых сферах. Наночастицы на основе диоксида кремния (SiNP) являются биологически совместимыми, и их можно получить с настраиваемыми структурными параметрами для соответствия вариантам их терапевтического применения.

Наночастица может представлять собой наночастицу кремния (силикон), такую как наночастица элементарного кремния. Наночастица может являться

20 мезопористой или характеризоваться сотовидной пористой структурой. В предпочтительном варианте наночастица представляет собой наночастицу элементарного кремния, которая характеризуется сотовидной пористой структурой. Такие наночастицы известны в данной области техники и обеспечивают

25 настраиваемую и контролируемую загрузку лекарственным средством, нацеливание и высвобождение, которые можно приспособить практически к любому грузу, пути введения, цели или профилю высвобождения. Например, такие наночастицы могут увеличить биологическую доступность своего груза и/или улучшить проницаемость кишечника и всасывание активных компонентов, вводимых пероральным способом. Наночастицы могут характеризоваться исключительно высокой емкостью загрузки

30 благодаря своей пористой структуре и большой площади поверхности. Наночастицы могут высвобождать свой груз в течение дней, недель или месяцев в зависимости от

их физических свойств. Поскольку кремний представляет собой природный элемент тела человека, наночастицы могут не вызывать ответ иммунной системы. Это свойство обеспечивает преимущество для безопасности наночастиц *in vivo*.

Любая из SiNP, описанных выше, может подвергаться биологическому разложению или не подвергаться биологическому разложению. Способная подвергаться биологическому разложению SiNP может растворяться до ортокремниевой кислоты, биологически доступной формы кремния. Было показано, что ортокремниевая кислота является благоприятной для здоровья костей, соединительной ткани, волос и кожи.

Наночастица может представлять собой липосому. Липосомы, как правило, состоят из биоразлагаемых нетоксичных фосфолипидов и содержат самособирающуюся фосфолипидную двухслойную оболочку с водной сердцевиной. Липосома может представлять собой однослойный пузырек, который содержит один фосфолипидный бислой, или многослойный пузырек, который содержит более концентрических фосфолипидных оболочек, разделенных слоями воды. Как следствие, липосомы могут быть приспособлены для включения гидрофильных молекул в водную сердцевину или гидрофобных молекул в фосфолипидные бислои. В липосомах в сердцевину можно инкапсулировать антиген для доставки. В липосомах в оболочку можно встроить гликопротеины оболочки вируса для получения виросом. Множество продуктов на основе липосом созданы в данной области техники и одобрены для применения у человека.

Наночастица может представлять собой иммуностимулирующий комплекс (ISCOM). ISCOM представляют собой частицы, подобные решетке, которые, как правило, образованы из коллоидных содержащих сапонин мицелл. ISCOM могут содержать холестерол, фосфолипид (такой как фосфатидилэтаноламин или фосфатидилхолин) и сапонин (такой как Quil A из дерева *Quillaia saponaria*). ISCOM традиционно использовали для захвата вирусных белков оболочки, таких как белки оболочки из вируса простого герпеса 1 типа, гепатита В или вируса гриппа.

Наночастица может представлять собой вирусоподобную частицу (ВПЧ). ВПЧ представляют собой самособирающиеся наночастицы, в которых отсутствует инфекционная нуклеиновая кислота, полученные в результате самосборки

биологически совместимого белка капсида. ВПЧ, как правило, составляют от приблизительно 20 до приблизительно 150 нм, например, от приблизительно 20 до приблизительно 40 нм, от приблизительно 30 до приблизительно 140 нм, от приблизительно 40 до приблизительно 130 нм, от приблизительно 50 до приблизительно 120 нм, от приблизительно 60 до приблизительно 110 нм, от приблизительно 70 до приблизительно 100 нм или от приблизительно 80 до приблизительно 90 нм в диаметре. ВПЧ в качестве преимущества используют возможности эволюционировавшей вирусной структуры, которая природным способом оптимизирована для взаимодействия с иммунной системой.

5 Оптимизированный природным способом размер наночастицы и повторяющийся структурный порядок означают, что ВПЧ индуцируют мощные иммунные ответы даже при отсутствии адъюванта.

Наночастица может представлять собой самособирающийся белок. Например, наночастица может содержать ферритин. Ферритин представляет собой белок, который может самособираться в почти сферические структуры размером 10 нм.

15 Наночастица может содержать главный белок свода (major vault protein, MVP). Десятью шестью единицами MVP могут самособираться в бочкообразную наночастицу со сводом, размер которой составляет приблизительно 40 нм в ширину и 70 нм в длину.

20 Наночастица может представлять собой наночастицу фосфата кальция (CaP). Наночастицы CaP могут содержать сердцевину, содержащую одну или более (например, две или более, 10 или более, 20 или более, 50 или более, 100 или более, 200 или более или 500 или более) молекул CaP. Наночастицы CaP и способы их получения известны в данной области техники. Например, стабильную наносuspension наночастиц CaP можно получить путем смешивания растворов неорганических солей

25 кальция и фосфатов в заранее определенных соотношениях при постоянном перемешивании.

Наночастица CaP может характеризоваться среднеарифметическим размером частицы от приблизительно 80 до приблизительно 100 нм, например, от приблизительно 82 до приблизительно 98 нм, от приблизительно 84 до приблизительно 96 нм, от приблизительно 86 до приблизительно 94 нм или от

30

приблизительно 88 до приблизительно 92 нм. Данный размер частицы может обеспечить лучшие рабочие характеристики в отношении захвата иммунными клетками и иммунного ответа, чем другие, большие размеры частиц. Размер частицы может быть стабильным (т.е. не демонстрировать значительного изменения),
5 например, при измерении в течение периода времени 1 месяц, 2 месяца, 3 месяца, 6 месяцев, 12 месяцев, 18 месяцев, 24 месяца, 36 месяцев или 48 месяцев.

Наночастицы СаР могут быть объединены с одним или несколькими антигенами, адсорбированными на поверхности наночастицы или совместно осажденными с СаР в процессе синтеза частицы. Например, пептид, такой как пептид
10 вируса гриппа, можно присоединить к наночастице СаР путем растворения пептида в DMSO (диметилсульфоксиде, например, в концентрации приблизительно 10 мг/мл), добавления к суспензии наночастиц СаР вместе с N-ацетилглюкозамином (GlcNAc) (например, в концентрации 0,093 моль/л) и сверхчистой воды, и перемешивания при комнатной температуре в течение периода времени приблизительно 4 часа (например,
15 1 час, 2 часа, 3 часа, 5 часов, 6 часов, 7 часов, 8 часов, 9 часов или 10 часов).

Композиция вакцины может содержать от приблизительно 0,15 до приблизительно 0,8%, например, от 0,2 до приблизительно 0,75%, от 0,25 до приблизительно 0,7%, от 0,3 до приблизительно 0,6%, от 0,35 до приблизительно 0,65%, от 0,4 до приблизительно 0,6% или от 0,45 до приблизительно 0,55%
20 наночастиц СаР. В предпочтительном варианте композиция вакцины содержит приблизительно 0,3% наночастиц СаР.

Наночастицы СаР характеризуются высокой степенью биологической совместимости благодаря их химическому подобию твердым тканям человека, таким как кости и зубы. Вследствие этого в качестве преимущества наночастицы СаР
25 являются нетоксичными при использовании для терапевтических вариантов применения. Наночастицы СаР являются безопасными для введения с помощью внутримышечного, подкожного, перорального пути или с помощью ингаляции. Наночастицы СаР также легко коммерчески синтезировать. Кроме того, наночастицы СаР могут обеспечивать медленное высвобождение антигена, что может усилить
30 индукцию иммунного ответа на пептид вируса гриппа, присоединенный к

наночастице. Наночастицы СаР можно применять как в качестве адъюванта, так и в качестве носителя для доставки лекарственного средства.

Наночастица может представлять собой наночастицу золота. Наночастицы золота известны в данной области техники и описаны, в частности, в публикациях WO 2002/32404, WO 2006/037979, WO 2007/122388, WO 2007/015105 и WO 2013/034726. Наночастица золота, присоединенная к каждому пептиду вируса гриппа, может представлять собой наночастицу золота, описанную в любой из публикаций WO 2002/32404, WO 2006/037979, WO 2007/122388, WO 2007/015105 и WO 2013/034726.

Наночастицы золота содержат сердцевину, которая содержит атом золота (Au). Сердцевина может дополнительно содержать один или более атомов Fe, Cu или Gd. Сердцевина может быть образована сплавом золота, таким как Au/Fe, Au/Cu, Au/Gd, Au/Fe/Cu, Au/Fe/Gd или Au/Fe/Cu/Gd. Общее число атомов в сердцевине может составлять от 100 до 500 атомов, например, от 150 до 450, от 200 до 400 или от 250 до 350 атомов. Наночастица золота может характеризоваться средним диаметром от 1 до 100, от 20 до 90, от 30 до 80, от 40 до 70 или от 50 до 60 нм. В предпочтительном варианте наночастица золота характеризуется средним диаметром от 20 до 40 нм.

Один или более лигандов, отличных от пептидов вируса гриппа, могут быть присоединены к наночастице, которая может представлять собой любой тип наночастицы, описанный выше. Лиганды могут образовывать «корону» - слой или покрытие, которое может частично или полностью покрывать поверхность сердцевин. Корону можно рассматривать как органический слой, который окружает или частично окружает сердцевину наночастицы. Корона может обеспечивать пассивирование или участвовать в пассивировании сердцевин наночастицы. Таким образом, в определенных случаях корона может представлять собой в достаточной степени полный слой покрытия для стабилизации сердцевин. Корона может способствовать растворимости наночастиц согласно настоящему изобретению, такой как растворимость в воде.

Наночастица может содержать по меньшей мере 10, по меньшей мере 20, по меньшей мере 30, по меньшей мере 40 или по меньшей мере 50 лигандов. Лиганды могут включать один или более пептидов, белковых доменов, молекул нуклеиновой кислоты, липидных групп, углеводных групп, анионных групп или катионных групп,

гликолипидов и/или гликопротеинов. Углеводная группа может представлять собой полисахаридную, олигосахаридную или моносахаридную группу (например, глюкозу). Один или более лигандов может представлять собой чужеродный компонент, который повышает вероятность захвата наночастицы антигенпрезентирующими клетками благодаря подобию патогенному компоненту. Например, один или более лигандов могут содержать углеводный фрагмент (такой как бактериальный углеводный фрагмент), поверхностно-активный фрагмент и/или фрагмент глутатиона. Примеры лигандов включают глюкозу, N-ацетилглюкозамин (GlcNAc), глутатион, 2'-тиоэтил-β-D-глюкопиранозид и 2'-тиоэтил-D-глюкопиранозид. Предпочтительные лиганды включают гликоконъюгаты, которые образуют гликонаночастицы.

Присоединению лигандов к сердцевине может способствовать линкер. Линкер может содержать тиольную группу, алкильную группу, гликольную группу или пептидную группу. Например, линкер может содержать C2-C15 алкил и/или C2-C15 гликоль. Линкер может содержать серосодержащую группу, аминоксодержащую группу, фосфатсодержащую группу или кислородсодержащую группу, способную ковалентно присоединяться к сердцевине. В качестве альтернативы, лиганды могут быть напрямую присоединены к сердцевине, например, с помощью серосодержащей группы, аминоксодержащей группы, фосфатсодержащей группы или кислородсодержащей группы, которая содержится в лиганде.

Присоединение к наночастицам

Пептиды вируса гриппа могут быть присоединены к наночастице на своем N-конце. Как правило, пептиды вируса гриппа присоединены к сердцевине наночастицы, однако также возможно присоединение к короне или лиганду.

Один или более пептидов вируса гриппа могут быть напрямую присоединены к наночастице, например, путем ковалентного присоединения атома в серосодержащей группе, аминоксодержащей группе, фосфатсодержащей группе или кислородсодержащей группе в пептиде, к атому в наночастице или ее сердцевине.

Для присоединения одного или нескольких пептидов вируса гриппа к наночастице можно применять линкер. Линкер может содержать серосодержащую

группу, аминокислотную группу, фосфатсодержащую группу или кислородсодержащую группу, способную ковалентно присоединяться к атому в сердцевине. Например, линкер может содержать тиольную группу, алкильную группу, гликольную группу или пептидную группу.

5 Линкер может содержать пептидную часть и непептидную часть. Пептидная часть может содержать последовательность $X_1X_2Z_1$, где X_1 представляет собой аминокислоту, выбранную из А и G; X_2 представляет собой аминокислоту, выбранную из А и G; и Z_1 представляет собой аминокислоту, выбранную из Y и F. Пептидная часть может содержать последовательность AAY или FLAAY. Пептидная
10 часть линкера может быть присоединена к N-концу пептида вируса гриппа. Непептидная часть линкера может содержать C2-C15 алкил и/ C2-C15 гликоль, например, тиоэтильную группу или тиопропильную группу.

Линкер может представлять собой (i) $HS-(CH_2)_2-CONH-AAY$; (ii) $HS-(CH_2)_2-CONH-LAAY$; (iii) $HS-(CH_2)_3-CONH-AAY$; (iv) $HS-(CH_2)_3-CONH-FLAAY$; (v) $HS-$
15 $(CH_2)_{10}-(CH_2OCH_2)_7-CONH-AAY$; и (vi) $HS-(CH_2)_{10}-(CH_2OCH_2)_7-CONH-FLAAY$. В данном случае тиольная группа непептидной части линкера присоединяет линкер к сердцевине.

Другие подходящие линкеры для присоединения вируса гриппа к наночастице известны в данной области техники, и специалист может легко их идентифицировать
20 и реализовать.

Когда композиция вакцины содержит пептид вируса гриппа, который содержит CD8+ Т-клеточный эпитоп, и пептид вируса гриппа, который содержит В-клеточный эпитоп, каждый пептид вируса гриппа может быть присоединен к отличной наночастице. В данном случае наночастица, к которой присоединен каждый
25 пептид вируса гриппа, может представлять собой один и тот же тип наночастицы. Например, каждый пептид вируса гриппа может быть присоединен к наночастице золота. Каждый пептид вируса гриппа может быть присоединен к наночастице СаР. Наночастица, к которой присоединен каждый пептид вируса гриппа, может представлять собой различные типы наночастицы. Например, один пептид вируса
30 гриппа может быть присоединен к наночастице золота, а другой пептид вируса гриппа может быть присоединен к наночастице СаР. Однако В предпочтительном варианте

что пептид вируса гриппа, который содержит CD8+ Т-клеточный эпитоп, и пептид вируса гриппа, который содержит В-клеточный эпитоп, присоединены к одной и той же наночастице. Например, пептид вируса гриппа, который содержит CD8+ Т-клеточный эпитоп, и пептид вируса гриппа, который содержит В-клеточный эпитоп, можно присоединить к одной и той же наночастице золота. Это обеспечивает получение одной частицы, способной стимулировать как специфичный к вирусу гриппа клеточный ответ, так и специфичный к вирусу гриппа гуморальный ответ.

CD4+ Т-клеточные эпитопы

Композиция вакцины согласно настоящему изобретению может дополнительно содержать пептид вируса гриппа, который содержит CD4+ Т-клеточный эпитоп. CD4+ Т-клеточные эпитопы определены выше.

Композиция вакцины может содержать два или более, например, три или более, четыре или более, пять или более, десять или более, пятнадцать или более или двадцать или более пептидов вируса гриппа, которые содержат CD4+ Т-клеточный эпитоп. Такие пептиды известны в данной области техники.

Пептид вируса гриппа, который содержит CD4+ Т-клеточный эпитоп, может представлять собой пептид, отличный от пептида вируса гриппа, кодирующего CD8+ Т-клеточный, и пептида вируса гриппа, кодирующего В-клеточный эпитоп. Пептид вируса гриппа, который содержит CD4+ Т-клеточный эпитоп, может содержать тот же пептид, что и пептид вируса гриппа, кодирующий CD8+ Т-клеточный. То есть, пептид вируса гриппа, который содержит CD8+ Т-клеточный эпитоп, может дополнительно содержать CD4+ Т-клеточный эпитоп.

Когда пептид вируса гриппа, который содержит CD8+ Т-клеточный эпитоп, содержит CD4+ Т-клеточный эпитоп, CD8+ эпитоп может быть вложен в CD4+ Т-клеточный эпитоп. CD4+ Т-клеточные эпитопы, как правило, длиннее CD8+ Т-клеточных эпитопов. Вследствие этого увеличение одного или обоих концов CD8+ Т-клеточного эпитопа может позволить получить более длинный CD4+ Т-клеточный эпитоп, последовательность которого все еще содержит CD8+ Т-клеточный эпитоп. Вследствие этого CD4+ Т-клеточный эпитоп может содержать CD8+ Т-клеточный эпитоп, такой как CD8+ Т-клеточный эпитоп, представленный в SEQ ID NO: 1 - 21,

удлиненный на N-конце или C-конце. CD8+ Т-клеточный эпитоп может быть удлинен на 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот на N-конце. CD8+ Т-клеточный эпитоп может быть удлинен на 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот на C-конце. В предпочтительном варианте CD8+ Т-клеточный эпитоп удлинен на 3 аминокислоты на N-конце, и на 3 аминокислоты на C-конце. Однако CD8+ Т-клеточный эпитоп не обязательно должен быть удлинен на одинаковое число аминокислот на каждом конце.

CD8+ Т-клеточный эпитоп, вложенный в удлиненные пептиды, может быть способен вызывать устойчивый ответ ЦТЛ. Удлиненный пептид (CD4+ Т-клеточный эпитоп) способен индуцировать опосредованные Т-хелперами цитокиновые ответы. Таким образом, включение в композицию вакцины пептида вируса гриппа, который содержит CD8+ Т-клеточный эпитоп и CD4+ Т-клеточный эпитоп, может позволить композиции вакцины индуцировать как цитотоксические ответы, так и ответы Т-клеток хелперов, обеспечивая улучшенный иммунитет против гриппа.

Как изложено в примерах, авторы настоящего изобретения идентифицировали множество потенциальных CD4+ Т-клеточных эпитопов, в которые вложен CD8+ Т-клеточный эпитоп, представленный в SEQ ID NO: 1 - 21. Данные эпитопы представлены в таблице 2.

Таблица 2

CD8-эпитоп	Удлиненный эпитоп (потенциальный CD4-эпитоп)	Белок	Мотив HLA
YINTALLNA (SEQ ID NO: 19)	kgvYINTALLNAsca (SEQ ID NO: 22)	полимераза PA	A2
PVAGGTSSIYI (SEQ ID NO: 1)	rflPVAGGTSSIYIevl (SEQ ID NO: 23)	полимераза PB2	A2
TVIKTNMI (SEQ ID NO: 2)	igvTVIKTNMIInnd (SEQ ID NO: 24)	полимераза PB1	A2/A24
AIMDKNIIL (SEQ ID NO: 20)	mdqAIMDKNIILkan (SEQ ID NO: 25)	неструктурный белок 1	A2/A24
ITFHGAKEI (SEQ ID NO: 4)	kreITFHGAKEIsls (SEQ ID NO: 26)	Матриксный белок 1	A2/A24
AINGITNKV (SEQ ID NO: 5)	tqnAINGITNKVnsv (SEQ ID NO: 27)	Гемагглютинин	A2/A24

Таким образом, пептид вируса гриппа, который содержит CD8+ Т-клеточный эпитоп и CD4+ Т-клеточный эпитоп, может содержать один или более пептидов, представленных в SEQ ID NO: 22 - 27. Пептид вируса гриппа, который содержит CD8+ Т-клеточный эпитоп и CD4+ Т-клеточный эпитоп, может содержать два или более, три или более, четыре или более или пять или более пептидов, представленных в SEQ ID NO: 22 - 27, в любой комбинации. Пептид вируса гриппа, который содержит CD8+ Т-клеточный эпитоп и CD4+ Т-клеточный эпитоп, может содержать все пептиды, представленные в SEQ ID NO: 22 – 27.

Пептид вируса гриппа, который содержит CD4+ Т-клеточный эпитоп, может быть присоединен к наночастице. Наночастица может представлять собой наночастицу золота. Наночастицы и присоединение к ним описаны выше.

Взаимодействие с супертипами HLA

Композиция вакцины может содержать по меньшей мере два пептида вируса гриппа, которые содержат CD8+ Т-клеточный эпитоп, каждый из которых взаимодействует с отличным супертипом HLA. Включение в композицию вакцины множества таких пептидов позволяет композиции вакцины вызывать CD8+ Т-клеточный ответ у большей доли индивидуумов, которым вводят композицию вакцины. Это обусловлено тем, что композиция вакцины должна быть способна вызывать CD8+ Т-клеточный ответ у всех индивидуумов супертипа HLA, который взаимодействует с одним из CD8+ Т-клеточных эпитопов, содержащихся в множестве пептидов вируса гриппа. Каждый CD8+ Т-клеточный эпитоп может взаимодействовать с HLA-A1, HLA-A2, HLA-A3, HLA-A24, HLA-B7, HLA-B8, HLA-B27, HLA-B44, HLA-B58 или HLA-B62, или с любым другим супертипом HLA, известным в данной области техники. Возможна любая комбинация пептидов вируса гриппа, содержащих такой CD8+ Т-клеточный эпитоп.

Композиция вакцины может содержать по меньшей мере один иммуногенный пептид, который взаимодействует по меньшей мере с двумя различными супертипами HLA. Вновь, это позволяет композиции вакцины вызывать CD8+ Т-клеточный ответ у большей доли индивидуумов, которым вводят композицию вакцины. Композиция вакцины может содержать по меньшей мере два, по меньшей мере три, по меньшей

мере четыре, по меньшей мере пять, по меньшей мере два, по меньшей мере пятнадцать или по меньшей мере двадцать иммуногенных пептидов, каждый из которых взаимодействует по меньшей мере с двумя различными подтипами HLA. Каждый иммуногенный пептид может взаимодействовать по меньшей мере с двумя, 5 по меньшей мере с тремя, по меньшей мере с четырьмя, по меньшей мере с пятью, по меньшей мере с шестью, по меньшей мере с 7, по меньшей мере с 8, по меньшей мере с 9 или по меньшей мере с 10 различными супертипами HLA. Каждый иммуногенный пептид может взаимодействовать с двумя или более из HLA-A1, HLA-A2, HLA-A3, HLA-A24, HLA-B7, HLA-B8, HLA-B27, HLA-B44, HLA-B58 или HLA-B62, или с 10 любым другим супертипом HLA, известным в данной области техники, в любой комбинации. В предпочтительном варианте композиция вакцины содержит иммуногенный пептид, который взаимодействует с HLA-A2 и HLA-24. В данном случае композиция вакцины может, например, содержать пептид вируса гриппа, который содержит CD8+ Т-клеточный эпитоп, содержащий один или более пептидов, 15 представленных в SEQ ID NO: 3 – 5.

Лекарственные средства, способы и терапевтическое применение

В настоящем изобретении предложен способ предотвращения или лечения инфекции вирусом гриппа, который включает введение вакцинных композиций 20 согласно настоящему изобретению индивидууму, инфицированному или подверженному риску инфицирования вирусом гриппа. В настоящем изобретении также предложена композиция вакцины согласно настоящему изобретению для применения в способе предотвращения или лечения инфекции вирусом гриппа у индивидуума.

25 Вирус гриппа может представлять собой вирус гриппа А, гриппа В и/или гриппа С. Вирус гриппа А может, например, представлять собой H1N1, H5N1, H7N9 или H3N2. Вирус гриппа может представлять собой вирус гриппа человека, вирус гриппа свиней или вирус гриппа птиц. Вирус гриппа может представлять собой пандемический вирус гриппа или потенциально пандемический вирус гриппа.

30 Композиция вакцины может быть предложена в виде фармацевтической композиции. Фармацевтическая композиция в предпочтительном варианте содержит

фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель. Фармацевтическая композиция может быть приготовлена в состав с применением любого подходящего способа. Приготовление в состав клеток со стандартными фармацевтически приемлемыми носителями и/или вспомогательными веществами можно осуществлять с помощью обычных в фармацевтической области способов. Точная природа состава будет зависеть от нескольких факторов, включая клетки, в которые планируется введение, и желаемый путь введения. Подходящие типы составов полностью описаны в руководстве Remington's Pharmaceutical Sciences, 19th Edition, Mack Publishing Company, Eastern Pennsylvania, USA.

Композицию вакцины или фармацевтическую композицию можно вводить любым путем. Подходящие пути включают, без ограничения, внутривенный, внутримышечный, интраперитонеальный, подкожный, внутридермальный, трансдермальный и пероральный/буккальный пути.

Композиции могут быть приготовлены вместе с физиологически приемлемым носителем или разбавителем. Как правило, такие композиции приготовлены в виде жидких суспензий наночастиц, связанных с пептидом. Наночастицы могут быть перемешаны с вспомогательным веществом, которое является фармацевтически приемлемым и совместимым с активным компонентом. Подходящие вспомогательные вещества представляют собой например, воду, солевой раствор, декстрозу, глицерол и т.п. и их комбинации.

Помимо этого, при необходимости, фармацевтические композиции могут содержать незначительные количества вспомогательных материалов, таких как смачивающие или эмульгирующие средства и/или pH-буферные средства.

Связанные с пептидом наночастицы вводят способом, совместимым с лекарственной формой, и в таком количестве, которое будет терапевтически эффективным. Количество, подлежащее введению, зависит от субъекта, лечение которого проводят, заболевания, лечение которого проводят, и активности иммунной системы субъекта. Точные количества наночастиц, необходимые для введения, могут зависеть от мнения практикующего врача и могут быть индивидуальными для каждого субъекта.

Субъекту можно ввести любое подходящее число наночастиц. Например, можно ввести по меньшей мере или приблизительно $0,2 \times 10^6$, $0,25 \times 10^6$, $0,5 \times 10^6$, $1,5 \times 10^6$, $4,0 \times 10^6$ или $5,0 \times 10^6$ наночастиц на кг пациента. Например, можно ввести по меньшей мере или приблизительно 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 клеток. В качестве
5 рекомендации число наночастиц согласно настоящему изобретению, подлежащее введению, может составлять от 10^5 до 10^9 , в предпочтительном варианте, от 10^6 до 10^8 .

Следует понимать, что различные варианты применения раскрытых продуктов и способов можно приспособить к конкретным потребностям данной области техники. Также следует понимать, что терминология, используемая в настоящем
10 документе, предназначена исключительно для описания конкретных вариантов реализации настоящего изобретения и не предназначена для ограничения.

Помимо этого, в настоящем описании и прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа включают упоминания объектов во множественном числе, если контекст однозначно не диктует обратное. Таким образом, например,
15 упоминание «CAR» включает «несколько CAR», упоминание «Т-клетки» включает две или более таких Т-клеток, упоминание о «компоненте» включает два или более таких компонентов и т.п.

Все публикации, патенты и заявки на патент, упоминаемые в настоящем документе, будь то выше или ниже, полностью включены в настоящий документ
20 посредством ссылки.

Дополнительные варианты реализации настоящего изобретения

1. Выделенный олигопептид или пептид в фармацевтической композиции, который содержит по меньшей мере один пептид, содержащий аминокислотную
25 последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1 - 18, причем указанный олигопептид или пептид состоит из от 8 до приблизительно 30 аминокислотных остатков, причем указанный олигопептид или пептид связывается с молекулами ГКГС класса I или может быть процессирован для связывания с молекулами ГКГС класса I и активации ответа Т-лимфоцитов, и причем олигопептид
30 или пептид находится в форме фармацевтически приемлемой соли.

2. Олигопептид по п. 1, отличающийся тем, что указанный олигопептид содержит по меньшей мере два эпитопных пептида.
3. Олигопептид по п. 1, отличающийся тем, что указанный олигопептид содержит по меньшей мере три эпитопных пептида.
- 5 4. Олигопептид по п. 1, отличающийся тем, что указанный олигопептид содержит по меньшей мере четыре эпитопных пептида.
5. Олигопептид или пептид по п. 1, отличающийся тем, что указанный олигопептид или пептид отличается от SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 или 18, причем указанное отличие касается не более чем одной единицы
10 аминокислоты.
6. Олигопептид или пептид по п. 5, отличающийся тем, что указанное отличие на одну аминокислоту является результатом консервативной замены аминокислоты.
7. Олигопептид или пептид по п. 5, отличающийся тем, что указанное отличие на одну аминокислоту представляет собой замену одной гидрофобной аминокислоты
15 другой гидрофобной аминокислотой.
8. Олигопептид или пептид по п. 5, отличающийся тем, что указанное отличие аминокислоты представляет собой добавление одной аминокислоты к указанному эпитопному пептиду или делецию одной аминокислоты из указанного эпитопного пептида.
- 20 9. Полинуклеотид в фармацевтической композиции, содержащей полинуклеотид, выбранный из группы, состоящей из: (а) полинуклеотида, который кодирует олигопептид или пептид по п. 1, и (b) полного комплемента (а), причем полинуклеотид находится в форме фармацевтически приемлемой соли.
10. Полинуклеотид по п. 9, отличающийся тем, что полинуклеотид (а)
25 представляет собой ДНК.
11. Полинуклеотид по п. 9, отличающийся тем, что полинуклеотид (а) представляет собой РНК.
12. Способ вакцинирования и лечения субъекта от инфекции гриппа, причем указанные инфицированные клетки экспрессируют любую молекулу ГКГС класса I,
30 причем указанный способ включает введение указанному субъекту композиции, которая связывается с молекулами МНС класса I или может быть преобразована для

- связывания с молекулами ГКГС класса I, содержащей: по меньшей мере один полипептид, который содержит эпитопный пептид, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1 – 18, в количестве, достаточном для индукции ответа ЦТЛ в указанных инфицированных клетках, и в форме фармацевтически приемлемой соли; или по меньшей мере один полипептид, который содержит эпитопный пептид, отличающийся по меньшей мере одной аминокислотой от аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1 – 18, в количестве, достаточном для индукции ответа ЦТЛ в указанных инфицированных клетках, и в форме фармацевтически приемлемой соли.
13. Способ вакцинирования и лечения субъекта от инфекции гриппа, причем указанные инфицированные клетки экспрессируют любую молекулу ГКГС класса I, причем указанный способ включает введение указанному субъекту композиции, которая связывается с молекулами МНС класса I или может быть процессирована для связывания с молекулами ГКГС класса I, содержащей: полинуклеотид, который содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую по меньшей мере один полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1 – 18, в количестве, достаточном для индукции ответа ЦТЛ в указанных инфицированных клетках, и в форме фармацевтически приемлемой соли; или по меньшей мере один полипептид, который содержит эпитопный пептид, содержащий отличие на одну аминокислоту от аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1 – 18, в количестве, достаточном для индукции ответа ЦТЛ в указанных инфицированных клетках, и в форме фармацевтически приемлемой соли.
14. Способ обеспечения иммунного ответа *ex vivo* с применением Т-клеток от субъекта, инфицированного гриппом, причем указанный способ включает: стимуляцию продукции ответа ЦТЛ для применения в пассивной иммунотерапии, причем указанные Т-клетки взаимодействуют по меньшей мере с одним полипептидом, который содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1 – 18, и в форме фармацевтически приемлемой соли; или по меньшей мере с одним полипептидом, содержащим отличие на одну

аминокислоту от аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1 – 18, и в форме фармацевтически приемлемой соли.

15. Способ по п. 14, отличающийся тем, что указанная адоптивная терапия на основе Т-клеток получена из аутологических субъектов или субъектов с
5 совпадающим HLA.

16. Способ оценки или диагностики иммунного ответа у субъекта, инфицированного гриппом или вакцинированного против гриппа и связанных вирусов, причем указанный способ включает: стимуляцию продукции ответа ЦТЛ, причем указанные Т-клетки взаимодействуют по меньшей мере с одним
10 полипептидом, который содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1 – 18, и в форме фармацевтически приемлемой соли; или по меньшей мере с одним полипептидом, содержащим отличие на одну аминокислоту от аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1 – 18, и в форме фармацевтически приемлемой соли.

17. Способ вакцинирования людей от инфекции гриппа с применением SEQ ID 1 – 18 в форме фармацевтически приемлемой соли.

Следующие примеры иллюстрируют настоящее изобретение.

20 **Пример 1**

Введение

Грипп представляет собой значительную мировую медицинскую проблему, ежегодно инфицируется более 20% населения Земли, что приводит к более, чем 5
25 миллионов случаев серьезных заболеваний и >300000 смертей по всему миру. Согласно оценкам, только в США каждый год с инфекцией гриппом связывают >30000 смертей и приблизительно 300000 случаев госпитализации (1). Учитывая недавнее появление нового тяжелого и потенциально рецидивирующего сезонного заболевания, Всемирная Организация Здравоохранения рекомендует проводить
30 широкомасштабные кампании по вакцинации, которые снижают частоту возникновения вызванного гриппом воспаления легких. Для эффективного снижения

частоты возникновения гриппа потребуется непрерывный и интенсивный эпидемический надзор, увеличение использования доступных на сегодняшний день вакцин против гриппа и наличие альтернативных вакцин и противовирусных лекарственных средств, способных обеспечивать более широкую защиту от штаммов гриппа с антигенным сдвигом и дрейфом генов (2). Успешные кампании по вакцинации против гриппа могут иметь огромное социальное и экономическое значение (3).

Иммунный ответ на вирус гриппа

Иммунный ответ на грипп регулируется как врожденным, так и адаптивным иммунитетом. Врожденный иммунный ответ на грипп ограничивает начальную репликацию вируса, но является относительно неспецифическим (3). Для эффективного выведения вируса гриппа требуется устойчивый адаптивный иммунный ответ, активирующий как гуморальный, так и клеточный иммунитет. Гуморальный иммунитет, который опосредуется секреторными антителами IgA и IgM, обеспечивает защиту от установления начальной инфекции, тогда как антитела IgG нейтрализуют вновь реплицирующийся вирус при установившейся инфекции (4, 5). Несмотря на то, что целью обычных вакцин против гриппа является индукция гуморального иммунитета против вируса гриппа, данные вакцины не являются полностью протективными из-за возникновения антигенных вариаций (6) (7). Дополнительно, данные свидетельствуют, что Т-клеточные ответы чрезвычайно важны для защиты от гриппа. CD4⁺ Т-клетки играют важную роль в переключении изотипов на IgG и в продукции антител с более высокой аффинностью (8) и ЦТЛ памяти (9-11). У людей ГА-специфичные CD4⁺ Т-клетки пролиферируют после вакцинации против гриппа (12) и способствуют развитию гетеросубтипических ответов антител против гриппа (13, 14). CD8⁺ цитотоксические Т-лимфоциты (ЦТЛ) опосредуют выведение вируса и, что важно, как было показано, характеризуются перекрестно-реактивными ответами на различные субтипы вируса гриппа А (15-17). Это может объяснить относительную редкость заболевания среди людей старшего поколения, которые ранее, возможно, получали вакцинацию против гриппа или которые ранее подвергались воздействию инфекции H1N1.

Актуальный статус разработки вакцин против вируса гриппа

Вакцины против гриппа, представленные на сегодняшний день на рынке, ежегодно обновляются, они разрабатываются на основании ежегодных рекомендаций ВОЗ относительно штаммов (16, 18), и их производят до начала сезона гриппа или пандемии. Имеющиеся на сегодняшний день вакцины против гриппа вызывают защитный гуморальный иммунный ответ против гликопротеинов ГА и НА поверхности вириона (7, 19, 20). Однако вирусные гликопротеины ГА и НА в большой степени подвержены частому и непредсказуемому антигенному сдвигу и менее частым, но более серьезным мутациям дрейфа генов, которые приводят к отсутствию распознавания антителами; в связи с этим требуется частая разработка новых вакцин, соответствующих актуальному серотипу или серотипам вируса, инфицирующих популяцию людей (21-25). Помимо этого, данные вакцины являются дорогостоящими в производстве и не будут защищать от новых штаммов, которые могут появиться в межсезонье (т.е. свиной грипп H1N1 2009 года, H5N1, H7N9). Более важно то, что данные вакцины сфокусированы на защите на основе антител и индуцируют незначительные Т-клеточные ответы, которые важны для устранения инфицированных вирусом клеток из организма.

На сегодняшний день три улучшенные сезонные вакцины против гриппа получили одобрение FDA. Эти четырехвалентные вакцины обеспечивают охват двух вирусов гриппа А и двух вирусов гриппа В. (В последние годы в течение сезонов гриппа совместно циркулировали два вируса гриппа В, и предложенные трехвалентные вакцины не защищали от одного из данных штаммов). FluMist – это четырехвалентная живая аттенуированная (ослабленная) вакцина, которая может обеспечить больше мишеней для иммунной системы благодаря ограниченному синтезу белка (который отсутствует в инактивированных вакцинах). На сегодняшний день FluMist (<http://www.cdc.gov/flu/protect/vaccine/vaccines.htm>) распространяется как альтернатива трехвалентной инактивированной вакцине. Fluarix и FluZone представляют собой четырехвалентные инактивированные вакцины, которые стимулируют иммунный ответ, подобный ответу на имеющуюся на сегодняшний день трехвалентную инактивированную вакцину. Данные вакцины будут распространяться

в течение сезона гриппа 2013 – 2014 годов

(<http://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/Vaccines/ApprovedProducts/ucm295057.htm>). Несмотря на охват, предлагаемый четырехвалентными вакцинами, они все еще являются сезонными и страдают от тех же недостатков, что и трехвалентная вакцина, а именно – длительности и высокой стоимости их получения и отсутствия мощных Т-клеточных ответов, которые устраняют инфицированные клетки, а также отсутствия защиты от инфекций, возникающих в межсезонье. Совершенно очевидно, что необходима универсальная вакцина, обеспечивающая защиту от большинства, если не всех, штаммов гриппа.

На сегодняшний день несколько составов универсальных вакцин находятся на стадии разработки. Эти вакцины можно в общем смысле охарактеризовать по типу защитного иммунного ответа, который они стимулируют: 1) В-клеточные ответы (антитела), 2) Т-клеточные ответы, или 3) как В-, так и Т-клеточные ответы. Kanekiyo с соавторами создали наночастицы ГА (белок гемагглютинин, ГА, гриппа, слитый с ферритином), индуцирующие высокий титр ответов антитела, которые обеспечивают охват множества штаммов гриппа (26). Клинические исследования данной вакцины еще не начаты. Вакцина на основе Т-клеток, нацеленная на четыре относительно консервативных эпитопа в вирусном геноме (27), также находится в процессе разработки. Т-клеточную вакцину на основе высококонсервативных CD4-эпитопов оценивали в провокационном исследовании II фазы с положительными защитными ответами против различных штаммов гриппа, включая пандемические штаммы (28). Рекомбинантная полиэпитопная вакцина, называемая Multimeric-001, которая содержит В-клеточный, CD4 Т-клеточный и CD8 Т-клеточный консервативные эпитопы из девяти различных белков гриппа (29), находится на ранней стадии клинических исследований. Вакцина на основе слитого белка, состоящая из нуклеопротеина (НП) и В-клеточного эпитопа M2e, связанных с адъювантом и пептидом M2e в наночастице золота в комбинации с CpG (30), также находится на стадии разработки. Большинство из упомянутых выше вакцин приготовлены в состав в виде белка или пептидов с различными адъювантами, которые вызывают побочные клинические эффекты. Напротив, состав полностью синтетической универсальной вакцины против гриппа, предложенной авторами настоящего изобретения, состоит из

панели консервативных эпитопов, активирующих CD4, CD8 и В-клетки, приготовленных в состав в наночастице золота для доставки вакцины, который характеризуется встроенными адъювантными свойствами и разработан для стимуляции мощных Т- и В-клеточных иммунных ответов, направленных против множества штаммов вируса гриппа, включая вновь возникающие штаммы.

Концепция синтетической универсальной вакцины от инфекции гриппа

Идеальная вакцина должна пытаться имитировать природный иммунитет (фиг. 1), образованный под действием инфекции способом, в результате которого формируются адаптивная гуморальная и клеточная иммунная память (31). Прилагаются огромные усилия для разработки универсальной вакцины против гриппа, которая будет эффективной против всех типов гриппа.

Целью является обеспечение защиты на годы, если не на всю жизнь, от всех сезонных штаммов гриппа и пандемических штаммов, что сделает иммунизацию против гриппа намного более похожей на традиционные вакцины. Разработка эффективной универсальной вакцины против гриппа устранил (или уменьшит) страх перед будущими пандемиями гриппа и будет более экономически выгодной, чем разработка и производство ежегодных сезонных вакцин против гриппа. Такая универсальная вакцина должна нацеливаться на консервативные эпитопы вируса гриппа, которые не меняются от штамма к штамму и, что более важно, должны презентироваться молекулами ГКГС на инфицированных клетках. Наконец, наиболее перспективную универсальную кандидатную вакцину против гриппа можно получить в результате объединения антигенов как для Т-, так и для В-клеточного иммунитета. На основании исследований на моделях на животных и исследований с участием людей имеет смысл объединение всех возможных Т- и В-клеточных лигандов (фиг. 1) для приготовления в состав активной синтетической вакцины. Для того, чтобы быть активной, вакцина должна характеризоваться размером в диапазоне, позволяющем осуществлять захват в цитозоль, и содержать встроенные сигналы опасности для нацеливания антигенпрезентирующих клеток. Было показано, что новые гликонаночастицы золота с данными свойствами индуцируют эффективные ответы на вакцину (32, 33). Настоящая заявка направлена на разработку синтетической

универсальной вакцины на основе общих Т-клеточных и В-клеточных эпитопов, встроенных в наночастицу золота.

Новизна

- 5 Предложенное решение содержит два основных новых отличия: (1) разработка полностью синтетической универсальной вакцины, способной индуцировать ответ Т-хелперов, цитотоксических Т-клеток и антител против множества штаммов инфекции гриппа, и (2) характеристики новой полностью синтетической платформы для
- 10 доставки вакцины на основе новых гликонаночастиц золота, вооруженной молекулами, стимулирующими врожденный и адаптивный иммунитет, которая будет выступать в качестве мощного адъюванта для любой субъединичной вакцины. Предложенный подход разработки вакцины будет характеризоваться несколькими преимуществами по сравнению с существующими вакцинами. Во-первых, вакцина будет содержать множество консервативных ограниченных по ГКГС класса I CD8+
- 15 Т-клеточных эпитопов, которые природным образом процессируются и презентуются на инфицированных клетках (34), CD8-эпитопы, вложенные в CD4-эпитопы, и эпитоп или эпитопы антитела из различных белков вируса гриппа. Во-вторых, данные эпитопы будут доставлены в синтетической гликонаночастице, которая содержит иммунные «сигналы опасности» (35, 36). Наконец, на данные новые
- 20 гликонаночастицы размером 20 – 40 нм, которые в отличие от других наночастиц содержат чужеродные компоненты (такие как углеводы бактерий, GlcNAc) помимо грипп-специфичных эпитопов, активирующих Т- и В-клетки, с большей вероятностью будут нацеливаться антигенпрезентирующие клетки, и данные гликонаночастицы с большей вероятностью будут захвачены антигенпрезентирующими клетками
- 25 благодаря их подобию патогену, для эффективной активации антиген-специфичных Т-клеток и ответов антител. Данные гликонаночастицы, как ожидается, также индуцируют созревание/активацию ДК, и, таким образом, устойчивый иммунный ответ, что является важным для успешного специфического ответа субъединичной вакцины (37, 38). Данные наночастицы также подходят для множества путей
- 30 доставки, включая трансдермальный и пероральный/буккальный, помимо способа доставки с помощью интрадермальной (внутрикожной) и подкожной инъекции.

Настоящая заявка также предназначена для ускорения доклинической разработки новой находящейся на стадии становления стратегии создания вакцины, которая характеризуется «встроенной» перекрестной эффективностью в отношении разных субтипов и которая может предотвратить значительное распространение внезапно возникшего или повторно возникшего штамма инфекции гриппа. Перекрестно-субтипическая вакцина, содержащая эпитопы иммуногенной консенсусной последовательности, может обеспечить достижение данной цели. Все больше данных свидетельствует о том, что эффективная универсальная вакцина должна индуцировать активацию как клеточноопосредованного, так и гуморального иммунитета. Авторы настоящего изобретения высказали предположение, что вакцина на основе определенных эпитопов, презантируемых инфицированными клетками, будет намного превосходить субъединицу вирусного белка или вакцины на основе эпитопа с предсказанным мотивом, поскольку процессинг белка иммунной системой может изменять нативные вирусные эпитопы. Помимо этого, CD8-эпитоп, встроенный в удлиненные пептиды, не только вызывает устойчивый ответ ЦТЛ, но удлиненные пептиды также способны индуцировать опосредованные Т-хелперами цитокиновые ответы, которые важны для борьбы с инфекцией гриппом (28). Добавление к данному составу синтетической вакцины универсального эпитопа антитела включает оба направления иммунной системы для обеспечения полной защиты.

Как продемонстрировано предварительными данными, полученными авторами настоящего изобретения, прямая идентификация Т-клеточных эпитопов, презантируемых на инфицированных клетках, представляет собой эффективный и логичный способ идентификации Т-клеточных эпитопов для вариантов применения вакцины. Анализ, проведенный авторами настоящего изобретения, подтвердил несколько Т-клеточных эпитопов, которые были отобраны с помощью методологий предсказания мотива ГКГС. Поскольку база данных иммунных эпитопов (IEDB; <http://www.iedb.org>) содержит несколько сотен предсказанных HLA-специфичных Т-клеточных эпитопов гриппа, включая множество общих эпитопов с высокими показателями связывания с ГКГС и ограниченными характеристиками ЦТЛ, важно подтвердить и использовать для применения в вакцине эпитопы, которые

презентируются инфицированными вирусом клетками. Дополнительно, поскольку база данных IEDB была создана способами предсказания мотива, а не функциональными способами, сложно отсортировать иерархию доминантности эпитопов, презантируемых в природе. Thomas с соавторами (39) изящно продемонстрировали, что клетками, инфицированными вирусом гриппа, презентуются как доминантные, так и субдоминантные эпитопы, и их будет сложно отсортировать с применением данных из базы данных IEDB. Еще одним недостатком эпитопов с предсказанным мотивом является то, что их скрининг в отношении функциональной специфичности наиболее часто проводили с применением ЦТЛ от инфицированных индивидуумов, которые, возможно, стали толеризированными.

Значительная инновация будет реализована в первой в истории комбинации Т-клеточных (CD8 и CD4) эпитопов и эпитопа антитела (M2e), выполненных в форме нацеленной, активирующей и регулирующей иммунитет полностью синтетической, адаптируемой системы для доставки вакцины на основе наночастиц. Авторы настоящего изобретения подчеркивают, что применение консервативных Т-клеточных эпитопов, которые в природе презентуются инфицированными клетками, и В-клеточного эпитопа, встроенного в наночастицы, представляет собой большой прорыв в технологии вакцин вместо небольшой корректировки компонентов вакцины. В случае успеха данный способ может привести к смене парадигмы получения составов профилактических и терапевтических вакцин. Работа авторов настоящего изобретения также будет полезна для усовершенствования общего понимания опосредуемого Т-клетками иммунного ответа на инфекцию вирусом гриппа. Данная информация является важной для разработки противовирусных лекарственных средств и профилактических и терапевтических универсальных вакцин для борьбы и предотвращения тяжелых, а в некоторых случаях летальных инфекций вирусом гриппа.

Результаты

Авторы настоящего изобретения идентифицировали панель HLA-A2-специфичных консервативных эпитопов из инфицированных клеток. С применением моноклеарных клеток периферической крови (МКПК), полученных от HLA-A2-

положительных здоровых доноров, авторы настоящего изобретения охарактеризовали выбранные эпитопы в отношении активности ЦТЛ и продемонстрировали перекрестную реактивность *in vitro*.

5 *Идентификация эпитопов гриппа, презантируемых ГКГС класса I*

10 JY, линию HLA-A2- и B7-положительных трансформированных ВЭБ В-клеток, HLA-A2- и A24-положительную линию клеток гепатомы HepG2 и дендритные клетки (ДК), образованные из HLA-A2-положительных лимфоцитов периферической крови (ЛПК) от здоровых индивидуумов, инфицировали штаммами вируса гриппа А и В (А/Новая Каледония/20/99 (H1N1), А/Висконсин/67/2005 (H3N2), В/Малайзия/2506/2004). Как для JY, так и для ДК в опубликованных исследованиях была продемонстрирована клеточная инфекция, составляющая ~50%, после применения ~10 ГАЕ, гемагглютинирующих единиц (40) в течение 16 – 24 ч, и данные линии клеток являются наиболее успешными для инфекций гриппа (41).

15 Инфицированные клетки использовали для выделения пептидов ГКГС, если они демонстрировали >50% инфекционности. Получали лизаты клеток, и проводили с ними два этапа иммунопреципитации с применением 1 мг W6/32 (пан-ГКГС класса I-специфичное антитело), конъюгированного с 1 мг бусин с белком А/Г (34). Связанные комплексы ГКГС элюировали с бусин, и смеси пептидов очищали и разделяли на

20 фракции с применением колонки C18 с обращенной фазой (ОФ). Фракции пептидов инжестировали по отдельности в систему ЖХ-МС/МС (жидкостной хроматографии–масс-спектрометрии, nanoAcquity UPLC -LTQ orbitrap) для идентификации пептидов ГКГС. Пептиды ГКГС и их соответствующие белки идентифицировали путем проведения поиска для необработанных данных в базе данных гриппа NCBI с

25 применением программного обеспечения Bioworks/Proteome Discoverer (Thermo). Синтетические пептиды были получены для валидации и подтверждения последовательностей. Синтетические пептиды подвергали анализу методом ЖХ-МС/МС при одинаковых условиях столкновения, что и для экспериментальных пептидов, и их последовательности подтверждали путем сравнения их спектра

30 МС/МС с таковым синтетических аналогов.

В таблице 31 приведены пептиды, связанные с ГКГС класса I, которые авторы настоящего изобретения идентифицировали в инфицированных вирусом гриппа клетках. Авторы настоящего изобретения идентифицировали 7 эпитопов с HLA-A2-связывающим мотивом, и 5 из 7 эпитопов содержали HLA-A24-перекрестно-связывающий мотив. Помимо этого, авторы настоящего изобретения идентифицировали несколько эпитопов, содержащих мотив HLA-B7 и B44. Все эпитопы происходят из областей белков, которые являются консервативными среди множества штаммов гриппа. Эти пептиды проверяли в экспериментах по совместному элюированию с применением синтетических пептидов. Интересно отметить, что авторы настоящего изобретения идентифицировали три эпитопа, о которых сообщалось ранее, два HLA-A2-специфичных эпитопа (P1 и P5) (42), которые идентифицировали с применением предсказания мотива и анализа ЦТЛ *ex vivo*, и один HLA-B7-специфичный эпитоп (LPF в таблице 3), который, как было показано, являлся консервативными среди пандемических вирусов гриппа A H1N1-2009 и H1N1-1918 (43).

Seq ID	Пептид	Белок	Мотив HLA
	YINTALLNA* (P1)	полимераза PA	A2
1	PVAGGTSSIYI (P2)	полимераза PB2	A2
2	TVIKTNMI (P3)	полимераза PB1	A2/A24
3	MTIIFLILM (P4)	гемагглютинин	A2/A24
	AIMDKNIIL* (P5)	неструктурный белок 1	A2/A24
4	ITFHGAKEI	Матриксный белок 1	A2/A24
5	AINGITNKV	Гемагглютинин	A2/A24
6	EEMGITTHF	Каталитическая субъединица РНК-направляемой РНК-полимеразы	B44
7	VETPIRNEW	Матриксный белок 2	B44
8	REILTKTTV	Щелочной белок полимеразы 2	B44

9	KESDEALNMTMASTP	Неструктурный белок NS1	B44
10	LENERTLDF	Кислый белок полимеразы	B44
11	MEAVPLITI	Гемагглютинин	B44
12	VEQEIRTF	Белок ядерного экспорта	B44
13	VEQELRTF	неструктурный белок 2	B44
	LPFDRTTIM*	Белок нуклеокапсида	B7
14	SPDDFALIVNA	полимераза PB1	B7
15	YPDTGKVM	Нейраминидаза	B7
16	YPDASKVM	нейраминидаза	B7
17	QPETCNQSI	Нейраминидаза	B7

Таблица 3: Эпитопы ГКГС класса I, презентируемые клетками, инфицированными вирусом гриппа

**Эпитопы, о которых сообщалось ранее*

5

До экспериментов по получению функциональных характеристик на ЦТЛ авторы настоящего изобретения подтвердили аутентичность 5 HLA-A2-специфичных пептидов, P1–P5 (таблица 3) с применением синтетических аналогов пептидов. Как проиллюстрировано на фигуре 2, большинство фрагментарных ионов в МС/МС спектре экспериментальным способом идентифицированных пептидов (фигура 2: P1-A–P5-A) совпадали со спектром их соответствующих синтетических пептидов, что подтверждается указанными массами (фигура 2: P1-B–P5-B) (34). Помимо этого, авторы настоящего изобретения дополнительно вручную верифицировали МС/МС спектр, чтобы подтвердить идентичность всех экспериментальным способом наблюдаемых пептидов. Т-клеточные эпитопы были приготовлены в наночастицы, и их исследовали в отношении индукции эпитоп-специфичных ЦТЛ и перекрестной реактивности *in vitro*.

Для верификации презентирования данных эпитопов инфицированными клетками получали ЦТЛ, специфичные к каждому из 5 пептидов, с применением МКПК от здоровых HLA-A2+ доноров и синтетических пептидов, соответствующих идентифицированным эпитопам. В анализе ELISpot функциональность ЦТЛ измеряли

посредством выявления антиген-специфичной секреции ИФН γ . Как проиллюстрировано на фигуре 3A, инфицированные PR8 клетки JY и HepG2 стимулировали все пять специфичных к эпитопу гриппа Т-клеток. Дополнительно, с применением клеток-мишеней HepG2, инфицированных различными штаммами гриппа А (X31, H3N2 и JAP, H2N2), была продемонстрирована перекрестная реактивность с другими штаммами, которая свидетельствует о презентировании данных эпитопов у клеток, инфицированных различными штаммами гриппа (фигура 3B).

Чтобы получить дополнительные характеристики иммунного ответа, вызванного данными эпитопами *in vivo*, авторы настоящего изобретения иммунизировали трансгенных мышей HLA-A2+ смесью вышеупомянутых пяти эпитопов. Иммунизации проводили с применением данных пептидов в присутствии в качестве адъюванта Montanide ISA 51 (фигура 4A). Авторы настоящего изобретения определили грипп-специфичный Т-клеточный ответ путем измерения секреции ИФН γ мыши в анализе ELISpot. С применением клеток T2, в которые вводили отдельные пептиды 1-5, авторы настоящего изобретения после иммунизации наблюдали ответ на все 5 пептидов (фигура 4B). В сочетании с описанными выше результатами *in vitro*, образованные *in vivo* ЦТЛ, специфичные к данным пептидам, стимулировались в равной степени хорошо, когда в качестве мишеней использовали клетки HepG2 и JY, инфицированные различными штаммами гриппа (фигура 4C); это свидетельствует, что данные эпитопы процессируются и презентуются при множестве инфекций гриппа. Помимо высвобождения ИФН γ , авторы настоящего изобретения также измеряли фенотипические изменения CD8⁺ Т-клеток из спленоцитов в отношении CD107a, маркера активации, присутствующего на гранулирующих эффекторных ЦТЛ (44, 45). Как проиллюстрировано на фигуре 4D, CD8⁺ Т-клетки продемонстрировали более высокую интенсивность окрашивания CD107a при инкубации с инфицированными мишенями по сравнению с неинфицированными мишенями.

Авторы настоящего изобретения получили наночастицы (НЧ) золота, содержащие HLA-A2-специфичные эпитопы (НЧ 1-5), и объединили их с общим эпитопом антитела (НЧ 6) из матриксного белка гриппа 2 (M2e). Авторы настоящего изобретения иммунизировали трансгенных мышей HLA-A2 пептидом + Montanide 51

или пептидами в НЧ и оценивали ответ ЦТЛ на основании высвобождения ИФН γ с применением ELISpot (фиг 5А и В) и экспрессии CD107a (фиг 5С). Пептиды, встроенные в НЧ, активировали мощный противовирусный ответ ЦТЛ *in vivo* без какого-либо дополнительного адъюванта. НЧ сами по себе выступали в качестве
5 адъюванта, помимо доставки пептидов к антигенпрезентирующим клеткам. Пептиды без адъюванта Montanide не вызывали ответ ЦТЛ (данные не показаны).

Помимо получения характеристик ответов ЦТЛ, авторы настоящего изобретения также оценивали ответы антитела на универсальный эпитоп антитела из матриксного белка гриппа 2 (М2е). С данной целью авторы настоящего изобретения
10 иммунизировали группу мышей пептидами ГКГС I (Р1-5) или пептидами в НЧЗ, наночастицах золота (НЧ 1-5), помимо пептида (Р6 или НЧ 6) из эктодомена М2 (М2е) (46, 47). Т-клеточные ответы, которые измеряли на основании анализа ИФН γ методом ELISpot (фигура 5А и В) и анализа CD107a методом проточной цитометрии (фигура 5С), были сравнимыми среди групп, которые иммунизировали Т-клеточными
15 эпитопами самими по себе (1-5) или Т-клеточными эпитопами с пептидом М2е (1-6). Затем измеряли концентрацию циркулирующего М2е-специфичного антитела с помощью стандартного анализа ELISA с применением сыворотки, отобранной в ходе итоговых заборов крови у иммунизированных мышей. Как проиллюстрировано на
фигуре 6, у мышей, иммунизированных пептидом М2е с адъювантом Montanide (Пеп.
20 6) или в НЧЗ (НЧ 6), образовался устойчивый и М2е-специфичный ответ IgG (фиг. 6А). Однако, когда пептид М2е объединяли с пептидами ГКГС I (Пеп. 1-5 или НЧ 1-5), титр антитела против М2е незначительно снижался. Разница в ответе антитела между пептидами + адъювантом Montanide и НЧЗ без какого-либо адъюванта отсутствовала, как авторы настоящего изобретения наблюдали и при Т-клеточном
25 ответе. Однако, когда авторы настоящего изобретения сравнивали три пептида без какого-либо адъюванта с НЧ, то наблюдали больший ответ антител при использовании НЧ (фиг. 6В). В заключение, авторы настоящего изобретения продемонстрировали, что НЧЗ, в которые были включены эпитопы ГКГС I и антитела, вызывали устойчивый как ответ ЦТЛ, так и ответы антител по сравнению с
30 эпитопами, для которых требуются адъюванты, вызывающие клиническую токсичность.

Затем функциональность антисыворотки M2e, образованной под действием пептида + адъюванта Montanide (P1-6, P6) и пептидов в НЧ (НЧ 1-6, НЧ 6), в отношении перекрестной реактивности характеризовали путем инфицирования клеток НерG2 и JY всеми тремя штаммами вируса гриппа (PR8, X-31 или JAP), которые авторы настоящего изобретения исследовали до этого. С применением проточной цитометрии авторы настоящего изобретения обработали инфицированные клетки M2e-специфичной антисывороткой, полученной от мышей, иммунизированных пептидом + Montanide или НЧ, и продемонстрировали специфичное связывание антитела на клетках, инфицированных PR8, X-31 или JAP (зеленый, голубой, красный, соответственно); это свидетельствует о присутствии данного эпитопа в клетках, инфицированных различными штаммами гриппа (фиг. 7).

Наконец, нейтрализующую способность данных антител определяли путем добавления антисыворотки к клеткам НерG2, инфицированным вирусом PR8. В клетки НерG2 вводили низкую дозу PR8 в присутствии сыворотки от мышей, иммунизированных пептидами ГКГС I (P1-5 или НЧ 1-5) или пептидом pM2e (pM2e или НЧ M2e), в разведении 1:50 в течение 1 ч. После инкубации в течение ночи с теми же уровнями сыворотки клетки фиксировали и внутриклеточно окрашивали в отношении НП гриппа. Показан процент положительных клеток. Залитые серым гistogramмы представляют собой неинфицированные контроли. Как проиллюстрировано на фигуре 8, уровни инфекции были ниже, когда использовали сыворотку, содержащую антитело против M2e, полученное с помощью пептида M2e с адъювантом Montanide (фиг. 8A), или пептида M2e в НЧЗ (фиг. 8B); это свидетельствует о функциональной способности M2e-специфичных антител.

25 Краткое описание

Это первое известное всеобъемлющее исследование по анализу пептидов, связанных с ГКГС класса I, на клетках, инфицированных вирусом гриппа. Важно подчеркнуть, что все эпитопы являются общими для различных штаммов гриппа. Интересно отметить, что авторы настоящего изобретения также идентифицировали на инфицированных клетках несколько эпитопов с предсказанным мотивом, о которых уже сообщалось. В дополнение к получению характеристик эпитопов ГКГС

I авторы настоящего изобретения также продемонстрировали широкую противовирусную активность антител против эпитопа антитела M2e. Авторы настоящего изобретения также получили наночастицы золота (НЧЗ), приготовленные в состав с эпитопами Т-клеток и эпитопами антител, и охарактеризовали
5 противовирусные ответы Т-клеток и ответы антител в исследованиях *in vitro* и *in vivo*. Данные, полученные авторами настоящего изобретения, окажут значительное влияние на разработку, приготовление в состав и получение характеристик универсальной вакцины против гриппа. Работа авторов настоящего изобретения также будет полезной для усовершенствования общего понимания опосредованного
10 Т-клетками иммунного ответа на инфекцию вирусом гриппа. Данная информация является важной для разработки противовирусных лекарственных средств и профилактических и терапевтических универсальных вакцин для борьбы и предотвращения тяжелых, а в некоторых случаях летальных инфекций вирусом гриппа.

15

Предстоящая работа

Авторы настоящего изобретения предлагают оценить частоту Т-клеток, специфичных к данным эпитопам, и ответ антител M2e у сезонно вакцинированных индивидуумов для оценки эндогенных клеточных и гуморальных ответов при
20 инфекции гриппом. Руководствуясь данной целью, авторы настоящего изобретения предварительно исследовали присутствие M2e-специфичных антител в общей популяции, которая подвергалась воздействию инфекции гриппом и получала сезонную вакцинацию. Авторы настоящего изобретения получали (заказывали в компании Research Blood Components LLC, Брайтон, Массачусетс) образцы сыворотки от 10 здоровых индивидуумов (5 мужчин и 5 женщин). Присутствие
25 антител против консервативного эпитопа M2e оценивали с применением стандартного анализа ELISA.

Различные разведения образцов сыворотки наносили на сенсibilизированные пептидом M2e лунки ELISA и обрабатывали вторичными антителами против IgG
30 человека и детектирующим средством Licor (34). Фактическое изображение лунок ELISA показано для каждого из индивидуумов с 4 различными разведениями.

Данные, представленные на фигуре 9, однозначно свидетельствуют, что у некоторых из индивидуумов продуцируются антитела против консервативного эпитопа M2e. Однако титры у некоторых индивидуумов были очень низкими. Интересно отметить, что инфекция гриппом и, возможно, сезонная вакцинация индуцируют эндогенный
5 ответ антител на данный универсальный эпитоп антитела. Иммунизация данным универсальным эпитопом и вызов устойчивого ответа антитела могут обеспечить эффективную защиту. Авторы настоящего изобретения планируют исследовать данную гипотезу в заявке II фазы.

Помимо ответа антитела на универсальный В-клеточный эпитоп, авторы
10 настоящего изобретения также планируют оценить частоту Т-клеток, специфичных к эпитопам ГКГС I, которые авторы настоящего изобретения идентифицировали и охарактеризовали в заявке I фазы. Для выполнения данной задачи авторы настоящего изобретения предлагают синтезировать тетрамер или декстрамеры ГКГС со специфичными эпитопами и провести скрининг ЛПК от индивидуумов, которые
15 подвергались воздействию вируса гриппа и получили сезонную вакцинацию против гриппа. Авторы настоящего изобретения имеют большой опыт анализов декстрамеров ГКГС с применением Т-клеточных эпитопов, полученных в результате инфекции вирусом лихорадки денге. Авторы настоящего изобретения провели скрининг нескольких пациентов, сероположительных к вирусу лихорадки денге, с применением
20 3 декстрамеров, содержащих HLA-A2-специфичные Т-клеточные эпитопы. Декстрамеры синтезировала компания Immudex (Фэрфакс, Вирджиния). МКПК очищали из цельной крови и окрашивали антителами против CD8 и декстрамерами. Окрашенные клетки анализировали на проточном цитометре Guava, и процент положительных данных получали с применением программного обеспечения
25 Guavasoft InCyte. Данные для четырех пациентов с декстрамерами, специфичными к трем различным эпитопам (NIQ, VTL, KLA), представлены на фигуре 10. У всех пациентов наблюдался некоторый уровень (0,5% – 4%) циркулирующих CD8+ Т-клеток, которые специфично связываются с декстрамерами с Т-клеточными эпитопами. Авторы настоящего изобретения также стимулировали данные Т-клетки
30 специфичными пептидами в краткосрочных культурах *in vitro* и получали данные о специфичном ответе ЦТЛ (фиг. 11). ЛПК от сероположительных к лихорадке денге

пациентов, у которых наблюдался высокий процент окрашивания декстрамером, р151 (фиг. 10), стимулировали пептидами в культуре в течение 7 дней. Активированные Т-клетки оценивали в отношении функции ЦТЛ путем внутриклеточного окрашивания продукции ИФН γ и анализа методом проточной цитометрии. Как показано на фигуре 5 11, активность ЦТЛ была значительной (0,7% - 1,1%) против отдельных мишеней, нагруженных пептидом (пеп. NIQ, пеп. KLA, пеп. VTL), а также мишеней, инфицированных серотипом 2 вируса лихорадки денге (DV2) (NIQ DV2, KLA DV2, VTL DV2). Данные анализа декстрамера и ЦТЛ нельзя сравнивать напрямую, однако интересно отметить, что декстрамер-положительные клетки способны повторно 10 активироваться специфичными эпитопами, а ЦТЛ являются функциональными при распознавании инфицированных вирусом клеток.

Для достижения активации вирус-специфичных CD4 и CD8 Т-клеточных ответов авторы настоящего изобретения предлагают синтезировать идентифицированные CD8 Т-клеточные эпитопы, включенные в удлиненный 15-мерный пептид, содержащий эндогенные последовательности. Данные более длинные пептиды характеризуются потенциалом стимулировать CD4+ Т-клетки. Для оценки эффективности таких более длинных пептидов при индукции активации ЦТЛ авторы настоящего изобретения исследовали хорошо охарактеризованную модель CD8 Т-клеточного эпитопа из овальбумина (SIINFEKL) (48). Авторы настоящего 20 изобретения синтезировали удлиненный пептид путем включения трех эндогенных фланкирующих аминокислотных остатков как на N-, так и на C-конце SIINFEKL (QLE SIINFEKL TEW) и оценивали, был ли более длинный пептид процессирован и презентируван CD8-эпитопом для активации Т-клеток.

Как продемонстрировано на фигуре 12A и B, когда модель эпитопа H2Kb 25 овальбумина, содержащая удлиненный пептид, была процессирована и презентирувана АПК (клетками LK^b) (фиг. 12A), достигалось распознавание Т-клетками и активация (фиг. 12B), которые свидетельствуют, что CD8-эпитоп, вложенный в более длинный пептид, способен процессироваться и активировать Т-клетки. Хотя презентирование эпитопа CD8 было ниже в клетках LK^b, в которые 30 вводили Ext SIIN, по сравнению с нагрузкой свободного пептида, что было ожидаемо, поскольку для Ext SIIN требуется интернализация и дополнительный процессинг,

активация Т-клеток была эквивалентной в АПК, в которые вводили Ext SIIN, что является более важным. Предположение заключается в том, что данные более длинные пептиды также будут выступать в качестве хелперных пептидов *in vivo* для мощной активации ЦТЛ и В-клеток для ответа на вакцину против гриппа.

5

Валидация безопасности доставки с помощью наночастиц

Хотя композиции вакцин на основе НЧЗ никогда не исследовали на людях, их оценивали в клиническом исследовании I фазы в отношении безопасности и доставки пептида инсулина у здоровых добровольцев, в которых они на сегодняшний день продемонстрировали хорошую безопасность. Помимо этого, предшествующие исследования безопасности *in vivo* и *in vitro* свидетельствуют, что частицы являются безопасными в очень высоких концентрациях в токсикологических исследованиях на крупных животных. Все отдельные компоненты наночастиц являются синтетическими, и они не продемонстрировали токсичность при введении по отдельности. Безопасность составов НЧЗ изучали в исследованиях *in vitro* с применением различных линий раковых клеток, цельной крови и слизистой оболочки щеки человека в отношении пролиферации клеток, высвобождения цитокинов и цитотоксичности, и при этом нежелательные явления не наблюдались. Различные вакцины и модели метастазирующей опухоли использовали для проведения токсикологических исследований с применением составов вакцины на основе наночастиц, и токсичность не была обнаружена. Помимо этого, токсичность не наблюдали в исследованиях визуализации CSIS *in vivo* на модели глиомы головного мозга мыши GL261 и в исследованиях сосудов сетчатки. Токсикологические исследования проводили согласно GLP (good laboratory practices, надлежащей лабораторной практике) с наночастицами, которые ежедневно вводили мышам внутривенно в течение 5 последовательных дней в теоретической дозе 5,4 мг/кг, и клинические признаки токсичности в моче, фекальных экскрементах или в органах, включая головной мозг, печень, почки, сердце, селезенку и легкие, отсутствовали.

30 *Общее заключение о предшествующей работе*

Работа, представленная в данном разделе, подчеркивает универсальный характер НЧЗ в качестве платформы для доставки мультиэпитопной вакцины и преимущества, достигнутые авторами настоящего изобретения в иммунном анализе вирусной инфекции. Для данного исследования в особенности имеет значение
5 большой опыт авторов настоящего изобретения в анализах связанных с ГКГС пептидов, идентификации Т-клеточных эпитопов и получении характеристик эпитопов в отношении функций Т-клеток в системах для доставки вакцины (49-52). На основании предварительных работ авторов настоящего изобретения, проведенных с раком (53, 54) и инфекционными заболеваниями, включая грипп (34) и лихорадку
10 денге (55), авторы настоящего изобретения считают, что они достигнут успеха при реализации предложенного проекта. Важно отметить, что методологии платформы для доставки вакцины и идентификации Т-клеточных эпитопов также широко применимы для других инфекционных заболеваний.

15 Методы

Анализ частоты ЦТЛ

Образцы лейкоцитарной пленки от HLA-A2- или A24-положительных здоровых индивидуумов, которые получали сезонную вакцинацию против гриппа,
20 будут заказаны в компании Research Blood Components LLC (Брайтон, Массачусетс). Авторы настоящего изобретения предлагают оценивать 6 – 10 пациентов. Будут получены конструкции тетрамера (Proimmune) и декстрамера (Immudex) пептида ГКГС с HLA-A2- и A24-специфичными пептидами. МКПК будут очищать из лейкоцитарных пленок согласно стандартным способам. МКПК будут окрашивать
25 конструкциями тетрамера (56) или декстрамера (57) согласно протоколу производителя. Клетки будут совместно окрашивать конъюгатом антитела против CD8 с ФИТЦ. Окрашенные клетки будут анализировать на проточном цитометре Guava (Millipore), и процент положительных данных будут получать с применением программного обеспечения Guavasoft InCyte (фиг. 10). Дважды окрашенные клетки
30 будут подсчитывать в виде процента от суммарных МКПК. Не имеет значения, будут

ли использованы в качестве отрицательных контролей имеющиеся в наличии тетрамеры или декстрамеры пептида ГКГС.

Активация ЦТЛ памяти и наивных ЦТЛ

5 Для активации наивных Т-клеток будет получена периферическая кровь от HLA-A2- или A24-положительных здоровых доноров (которую закажут в компании Research Blood Components, LLC. Брайтон, Массачусетс). Мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК) будут очищать с применением среды для разделения лимфоцитов (Mediatech) с помощью дифференциального центрифугирования
10 согласно стандартным способам. МКПК будут высевать в полной среде RPMI 1640 в течение ночи. Неприкрепившиеся клетки удалят и сохранят. В прикрепившиеся к пластику клетки введут 50 мкг/мл синтетического пептида и 1,5 мкг/мл β 2-микроглобулина человека (EMB Biosciences, Гиббстаун, Нью-Джерси) в полной среде в течение 2 ч. Затем вновь добавляют неприкрепившиеся клетки в 5 мл полной среды с
15 добавлением ИЛ-7 в концентрации 5 нг/мл, колониестимулирующего фактора гранулоцитов-моноцитов (Granulocyte Monocyte Colony Stimulating Factor, GM-CSF) в концентрации 25 нг/мл и ИЛ-4 в концентрации 50 нг/мл (все цитокины и факторы роста закажут в компании Reprotech, Роки Хилл, Нью-Джерси). Планшеты будут инкубировать при температуре 37 °C в увлажненном инкубаторе с 5% CO₂ в течение
20 12 дней. Т-клетки будут повторно стимулировать один раз аутологичными МКПК, истощенными по CD4⁺/CD8⁺ Т-клеткам, в которые вводили синтетический пептид в концентрации 10 мкг/мл и 1,5 мкг/мл β 2-микроглобулина человека в полной среде, содержащей 5 нг/мл ИЛ-7 и 10 Ед./мл ИЛ-2, в течение 5 дней. Повторную стимуляцию будут повторять трижды перед использованием в анализах ЦТЛ. Анализы ЦТЛ будут
25 проводить с применением нагруженных пептидом клеток Т2 и клеток-мишеней, инфицированных различными штаммами гриппа, как описано в публикации (34). Для активации Т-клеток памяти МКПК будут один раз активировать с помощью АПК, в которые вводили пептид, как описано выше, перед анализами ЦТЛ (фиг 11).

30 Стимулированное антигеном высвобождение интерферона- γ (ИФН- γ) и гранзима В в качестве показателя активации ЦТЛ будут анализировать в соответствующих анализах ELISPOT (58, 59). Клетки Т2, в которые вводили пептид,

наряду с клетками T2, в которые вводили нерелевантный пептид HLA-A2 (1 микрограмм/мл пептида в течение 2 ч при температуре 37°C), будут использовать в качестве контролей вместе с инфицированными и неинфицированными гриппом клетками в качестве мишеней. Помимо этого, секрецию различных цитокинов (ИФН-
5 гамма, ФНО-альфа, гранзим В) будут оценивать с помощью технологии MagPlex Luminex (Millipore). Во все анализы будут включены соответствующие контроли, включающие T2, в которые не вводили пептид, и РНА, для стимуляции неспецифичной индукции ИФН-гамма под действием ЦТЛ в качестве отрицательного и положительного контролей.

10

Ответ M2e-специфичных антител

Образцы сыворотки от здоровых индивидуумов, которые получали сезонную вакцинацию против гриппа, будут использовать для анализа присутствия специфичных к консервативному эпитопу M2e антител с применением стандартных
15 методик ELISA (фиг 9). Дополнительно, образцы сыворотки будут использовать для измерения распознавания эпитопа антитела M2e на поверхности инфицированных клеток. Клетки HerpG2 будут инфицировать вирусами PR8, X31 и JAP, как описано ранее (34). После инкубации в течение ночи клетки будут окрашивать образцами сыворотки в разведении 1:50, а затем – меченным ФИТЦ вторичным антителом
20 против IgG мыши (Invitrogen). Образцы будут анализировать с применением проточного цитометра Guava и программного обеспечения GuavaSoft InCyte.

Разработка состава НЧ с CD8-эпитопом, вложенным в более длинный пептид, и характеристики ответов CD4 и CD8 in vitro и in vivo

25 Клеточный иммунитет (КИ), который вызывают ограниченные по главному комплексу гистосовместимости (ГКГС) класса I CD8+ цитотоксические Т-лимфоциты (ЦТЛ), играет центральную роль в контроле инфекции вирусом гриппа (60-63) (6). КОИ, образованный в результате первичной инфекции гриппом, обеспечивает существенную защиту от серологически различных вирусов благодаря
30 распознаванию перекрестно-реактивных эпитопов, часто из внутренних вирусных белков, консервативных среди субтипов вирусов (64-66). Важно отметить, что,

помимо роли ЦТЛ в опосредовании выведения вируса (67, 68), было показано, что CD8⁺ Т-клетки у людей характеризуются перекрестно-реактивными острыми ответами (15-17) и ответами памяти (25) на различные субтипы вируса гриппа А. В исследованиях инфекции гриппа на мышах было выявлено, что выведение вируса опосредовано антиген-специфичными CD8⁺ эффекторными Т-клетками, тогда как CD4⁺ Т-клетки памяти важны для поддержания ответов CD8⁺ Т- и В-клеток памяти (69). Недавно было установлено, что эффекторные CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетки участвуют в контроле воспаления легких и ограничивают чрезмерное повреждение тканей в результате продукции интерлейкина-10 (70). В исследованиях *in vitro*, демонстрирующих реактивность CD4⁺ Т-клеток, праймированных сезонными штаммами, против ранее не встречавшихся штаммов, например, против H5N1 птиц, было высказано предположение о потенциальной защитной роли CD4⁺ Т-клеток (71-74). В контексте пандемий, при которых отсутствуют ранее существующие защитные антитела, Т-клетки могут опосредовать защиту или ограничивать тяжесть связанных с гриппом заболеваний у людей (75). Было показано, что ранее существующие Т-клеточные ответы модулируют тяжесть гриппа в контексте существующих антител (15). Недавно Wilkinson с соавторами исследовали роль КОИ в ограничении гриппа с применением удлинённых CD4-активирующих пептидов, полученных из консервативных областей генома гриппа, на модели стимуляции антигеном человека у здоровых добровольцев, у которых отсутствовал обнаруживаемый гуморальный иммунитет на штаммы, которыми проводили стимуляцию, и продемонстрировали широкий спектр защиты (28). Интересно отметить, что в некоторых случаях в данные удлинённые пептиды были встроены (введены) эпитопы ГКГС класса I, о которых сообщалось ранее, активирующие CD8⁺ Т-клеточные ответы (28, 34). В свете значительной роли CD4⁺ и CD8⁺-положительных Т-клеточных ответов в защите от инфекции гриппом авторы настоящего изобретения предложили приготовить вакцину в состав с идентифицированными CD8 Т-клеточными эпитопами, вложенными в удлинённые пептиды, которые характеризуются потенциалом активировать CD4⁺ Т-клетки. С данной целью авторы настоящего изобретения синтезируют удлинённые пептиды путем включения трех эндогенных фланкирующих аминокислотных остатков как на N-, и на C-конце эпитопов A2 и A24. Данные удлинённые пептиды

будут приготовлены в состав в наночастицах золота, и будет проведено их исследование в отношении CD4- и CD8-положительных Т-клеточных ответов *in vitro* с МКПК человека и *in vivo* на трансгенных мышах А2 в отношении ответов ЦТЛ.

5 Получение наночастиц с эпитопами

На этапе синтеза будут получены как CD8, так и удлинённые пептиды CD4 (таблица 4), содержащие смешанный алифатический/полиэтиленовый линкер, присоединённый к отщепляемому катепсином В дипептиду, который примыкает к выбранным эпитомам пептида. Конъюгаты пептидов встраивают в наночастицы

10 путем одноступенчатой химической реакции самосборки, которая приводит к получению наночастиц с металлическими сердцевинами из золота размером ~1,6 нм и короной из смешанных лигандов, содержащей глюкозу и два-пять углеродных спейсеров, как описано ранее (35). Смеси пептидов (0,94 мг каждого, 0,35 микромоляр)

15 будут растворять в ТФУ (трифторуксусной кислоте, 20 микролитров), и раствор будут концентрировать в потоке аргона до образования масла. Будут добавлять MeOH (1250 микролитров), и реакционную смесь будут встряхивать на вортексе в течение 20 секунд. Затем к раствору метанола добавляют Glc-лиганд (1,34 мг, 5,60 микромоляр) и GlcNHAc-лиганд (1,23 мг, 4,37 микромоляр), pH откорректируют до 2 с помощью ТФУ (2 микролитра). Добавят водный раствор H₂AuCl₄ (300 микролитров, 7,5 микромоляр),

20 и раствор будут встряхивать на вортексе в течение 20 секунд. Для последующего анализа содержания золота отберут аликвоту 50 микролитров. К оставшемуся раствору добавят 1 н водный раствор NaBH₄ (165 микролитров, 165 микромоляр) в нескольких частях при быстром встряхивании. Черную суспензию, которая образуется, будут встряхивать и осаждают центрифугированием. Затем осадок

25 растворят в воде и диализуют. Соотношение различных лигандов на поверхности нанокластера будут оценивать путем сравнения 1H ЯМР-спектра исходной смеси, образованных НЧ и восстановленных материнских жидкостей после процесса самосборки, как было описано ранее (35).

CD8-эпитоп	Удлинённый эпитоп (потенциальный CD4-эпитоп)	Белок	Мотив HLA
YINTALLNA	kgvYINTALLNAsca	полимераза PA	A2
PVAGGTSSIIYI	rflPVAGGTSSIIYlevl	полимераза PB2	A2
TVIKTNMI	igvTVIKTNMIInnd	полимераза PB1	A2/A24
AIMDKNIIL	mdqAIMDKNIILkan	неструктурный белок 1	A2/A24
ITFHGAKEI	kreITFHGAKEIsls	Матриксный белок 1	A2/A24
AINGITNKV	tqnAINGITNKVnsv	Гемагглютинин	A2/A24

Таблица 4: CD8-эпитопы и удлинённые потенциальные CD4-эпитопы. Показана рестрикция по HLA для CD8-эпитопа.

5 Оценка эпитоп-специфичных CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеточных ответов *in vitro*

- Авторы настоящего изобретения предлагают оценить способность составов вакцины на основе наночастиц активировать специфичные CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеточные ответы. МКПК будут выделены от доноров, как описано выше, и в них введут состав вакцины на основе НЧ или, в качестве контроля, синтетические пептиды сами по себе.
- 10 Эпитоп-специфичные Т-клетки будут очищать с помощью положительного отбора с применением бусин, конъюгированных с антителами против CD4 или CD8 (Dynabeads, Invitrogen), отсоединения от бусин (DetahABead, Invitrogen) и использования в последующих вариантах применения. Свежеочищенные эпитоп-специфичные CD4⁺ или CD8⁺ Т-клетки будут культивировать в течение ночи с
- 15 антигенпрезентирующими клетками, в которые вводили соответствующие пептиды или которые инфицировали различными штаммами вируса гриппа (PR8, X31, JAP). Активацию Т-клеток будут оценивать тремя способами: 1) Анализ ИФН-гамма ELISpot, 2) анализ секреции цитокинов, выявленной с помощью технологии MagPlex Luminesx (ИФН-гамма, ФНО-альфа, гранзим В, ИЛ-2) и, для CD8⁺ Т-клеточных
- 20 ответов, 3) выявление экспрессии маркера дегрануляции CD107a на CD8⁺ Т-клетках методом проточной цитометрии. Во всех экспериментах неинфицированные АПК и АПК, в которые ничего не вводили, будут использовать в качестве отрицательных контролей.

Ожидаемый результат и технические задачи: Авторы настоящего изобретения прогнозируют, что составы на основе НЧ вызовут более устойчивые CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеточные ответы, чем пептид сам по себе, и что данные Т-клетки распознают клетками-мишени, инфицированные каждым из различных штаммов вируса гриппа. Однако авторы настоящего изобретения могут наблюдать, что удлиненные пептиды не активируют эффективно CD4 Т-клетки. В данном случае авторы настоящего изобретения могут увеличить длины пептида для включения большего числа остатков или напрямую добавить в состав валидированные CD4 Т-клеточные эпитопы. Авторы настоящего изобретения не предвидят проблем с экспериментами самими по себе, поскольку имеют большой опыт работы с предложенными методиками, включая инфекцию вирусом гриппа. Если любая из вышеописанных методик станет проблематичной, например, в связи с проблемой с числом клеток, авторы настоящего изобретения могут применять многопараметровую проточную цитометрию, оценивающую внутренние уровни ключевых цитокинов (ИФН- γ , ФНО-альфа, гранзима В), для идентификации активированных CD4 и CD8⁺ Т-клеток в одной культуре.

Оценка эпитоп-специфичных CD8⁺ Т-клеточных ответов in vivo

Исследования на трансгенных мышях HLA-A2 и A24 (Taconic, Хадсон, Нью-Йорк) будут переданы внешнему подрядчику, компании Lampire Biologics Laboratories (Пиперсвилл, Пенсильвания). Вкратце, самок мышей в возрасте 4 – 8 недель будут иммунизировать по 10 мкг каждого состава вакцины, содержащего удлиненные пептиды, в двух местах: в.д. (внутридермально) в основании хвоста и п.к. (подкожно) в бок. В качестве контролей мышей будут иммунизировать ФБР или пептидом + адъювантом Montanide. Всех мышей будут иммунизировать по три раза каждую в дни 0, 10 и 30. Через семь дней после итоговой иммунизации селезенки отберут, разотрут между стерильными матовыми предметными стеклами и отфильтруют через сетчатый фильтр с размером отверстий 0,45 мкм для получения суспензий отдельных клеток. Суспензию отдельных клеток будут использовать для очистки CD8⁺ Т-клеток с помощью отрицательного отбора. Клетки будут использовать немедленно в тех же анализах в течение ночи, описанных выше, в

разделе *in vitro*: ELISpot, секреции цитокинов и проточной цитометрии для выявления дегрануляции. Помимо функциональных анализов, специфичности CD8⁺ Т-клеток будут оценивать с применением технологии тетрамера ГКГС I, как описано в Цели 1.

- 5 Ожидаемый результат и технические задачи: Авторы настоящего изобретения ожидают, что будут наблюдать активацию Т-клеток, специфичных к пептиду-антигену, *in vivo* на иммунизированных мышах. Также авторы настоящего изобретения прогнозируют, что у мышей, иммунизированных составами на основе НЧ, будет наблюдаться более устойчивый Т-клеточный ответ в ответ на АПК, в
- 10 которые вводили пептид или которые инфицировали пептидом, по сравнению с группами ФБР или пептида + Montanide. Если авторы настоящего изобретения будут наблюдать, что некоторые пептиды не индуцируют ответ у данных мышей, они смогут легко изменить составы вакцины добавлением дополнительных консервативных эпитопов. Авторы настоящего изобретения имеют большой опыт работы с
- 15 трансгенными моделями HLA-A2 и HLA-A24 и вследствие этого не предвидят каких-либо проблем при применении данных модельных систем на основе трансгенных мышей.

- Оценка защиты составов вакцины на основе НЧ in vivo на модели антигенной*
- 20 *стимуляции вирусом с применением трансгенных мышей HLA-A2 и A24*

- Актуальность исследования: Для того, чтобы вакцина считалась эффективной, она должна в значительной степени снижать как длительность, так и тяжесть заболевания, если не полностью предотвращать установление инфекции патогеном.
- 25 Вакцины против множества штаммов патогенов, таких как вирус гриппа, будут значительно улучшены, если они смогут индуцировать широкую защиту против большинства штаммов. С этой целью авторы настоящего изобретения напрямую исследуют состав вакцины на основе НЧ, содержащий Т- и В-клеточные эпитопы, на модели антигенной стимуляции вирусом и определяют, сможет ли данная вакцина
- 30 снизить заболеваемость и смертность от двух различных штаммов гриппа. Авторы настоящего изобретения проведут полное исследование на модели на трансгенных

мышцах HLA-A2 и в случае успеха повторят исследования снижения массы тела и летального инфицирования на модели на трансгенных мышцах HLA-A24.

Методы: Для оценки защиты *in vivo* после иммунизации вакциной на основе НЧ авторы настоящего изобретения будут использовать модель стимуляции антигенами гиппа, разработанную сотрудником авторов настоящего изобретения доктором Питером Кацикисом (Dr. Peter Katsikis) из Дрексельского университета (76). Линии трансгенных мышей HLA-A2 (Taconic, Хадсон, Нью-Йорк) будут использовать для оценки защиты, вызванной приготовленными в состав с НЧ вакцинами, содержащими специфичные к вирусу гриппа Т- и В-клеточные эпитопы. Вкратце, авторы настоящего изобретения планируют использовать самок мышей и исследовать предложенную схему вакцинации, состоящую из 3 иммунизаций (в дни 0, 10 и 30). Мышей будут иммунизировать по 10 мкг каждого из составов вакцины на основе пептида и НЧ в двух местах: в.д. в основании хвоста и п.к. в бок. В качестве контролей также будут вводить пептиды с адьювантом и без него (Montanide ISA 51).

После вакцинации авторы настоящего изобретения ответят на множество важных вопросов. **1)** Индуцирует ли вакцинация НЧ устойчивый вторичный ответ ЦТЛ после антигенной стимуляции вирусом гриппа, **2)** снижает ли вакцинация НЧ вирусные нагрузки или ускоряет выведение вируса, **3)** защищает ли вакцинация НЧ от заболеваемости, вызванной сублетальной инфекцией вируса гриппа, и **4)** защищает ли вакцинация НЧ от летального инфицирования вирулентным штаммом вируса гриппа? Для исследований заболеваемости авторы настоящего изобретения будут стимулировать вакцинированных животных антигеном через 45 дней после иммунизации сублетальной дозой инфекционного вируса гриппа А PR8 (H1N1, А/Пуэрто-Рико/8/34). Мышей будут инфицировать и.н. (интраназально), и заболеваемость будут оценивать двумя способами: путем оценки массы тела и вызванной вирусом патологии легких. Изменения массы тела будут контролировать путем взвешивания мышей ежедневно в течение 14 дней, начиная с дня антигенной стимуляции вирусом (76, 77). Авторы настоящего изобретения будут использовать n=9 животных на группу (см. раздел «Позвоночные животные» предложения по анализу мощности). Данные количества будут использовать в трех независимых

экспериментах. На основании предварительных данных, когда снижение массы тела животных дикого типа с дня 8 – 10 после инфекции сравнивают с днем 0, величина эффекта составляет 20,4%. Величина эффекта для предполагаемого снижения массы тела вакцинированных мышей на 50% составляет 10,2%. Для такого различия 5 величины эффекта ($\square$) со стандартным отклонением ($\square$) ~5,2% будет требоваться 6 животных на группу, для $\alpha=0,05$ при 80% мощности и использовании двухстороннего критерия. Поскольку инфекция не всегда может возникнуть или животные могут погибнуть из-за обезболивания или инфекции, авторы настоящего изобретения будут использовать по 9 мышей на группу эксперимента, чтобы 10 убедиться, что достаточное количество животных будет в наличии.

После инъекции PR8 будут оценивать вызванное вирусом воспаление легких и патологическую анатомию. В дни 6 и 10 после инфекции мышей будут умерщвлять и отбирать легкие. Легкие будут использовать для патологоанатомического исследования, и некоторые доли будут использовать для получения расщепленных 15 коллагеназой и ДНКазой суспензий отдельных клеток. Суспензии отдельных клеток будут использовать для количественного определения абсолютных количеств CD4+ Т-клеток, CD8+ Т-клеток, клеток NK (natural killer, природных киллеров), В-клеток, ДК, макрофагов и гранулоцитов, инфильтрующих легкие. Дополнительно будут исследовать профиль активации данных клеток методом проточной цитометрии с 20 окрашиванием суспензий клеток в отношении CD25, CD69, CD80/86 и ГКГС класса II. Помимо этого, авторы настоящего изобретения будут оценивать патологическую анатомию легких. Будут оценивать как макропатологические изменения на основании размера, внешнего вида и цвета легких, так и гистопатологические изменения, оцениваемые с помощью окрашивания гематоксилином и эозином (78, 79). 25 Патологическая анатомия легких позволит авторам настоящего изобретения оценить, защитила ли вакцинация от повреждения легких. Патологическую анатомию легких будут оценивать гистологическим способом с помощью окрашивания гематоксилином и эозином силами сотрудников Отделения патологической анатомии. Помимо измерений заболеваемости, будут оценивать вирусную нагрузку в легких 30 путем амплификации матричного гена вируса (76) методом ПЦР в режиме реального времени в дни 3, 6 и 10 после инфекции.

При оценке эффективности вакцины важно определить, вызваны ли мощные вторичные ответы режимом вакцинации. Для оценки того, приводит ли вакцинация мультиэпитопными НЧ, предложенными авторами настоящего изобретения, к устойчивым вторичным ответам, авторы настоящего изобретения измерят CD8+ Т-клеточный ответ и ответ антител против M2e после инфекции вирусом гриппа. Легкие и селезенки отберут в дни 3, 6 и 10 после инфекции, и CD8+ Т-клеточные ответы будут анализировать с помощью окрашивания нагруженных пептидом тетрамеров ГКГС класса I и стимулированного пептидом внутриклеточного ИФН γ . Кровь будут собирать в момент забора, и антитела против M2e в сыворотке будут измерять методом ELISA. Нейтрализующие антитела против гриппа в сыворотке будут анализировать с применением анализа ингибирования гемагглютинации.

Наконец, чтобы убедиться, что составы вакцины на основе НЧ могут защитить от диапазона вирусов гриппа и от летального инфицирования, авторы настоящего изобретения проведут летальное инфицирование 10 x LD₅₀ вируса гриппа A Eq/Lon (H7N7 A/Конский/Лондон/1416/73) – штамма, который является высокопатогенным для мышей (80, 81). Как и в случае инфекций PR8, в качестве показателя защиты будут контролировать массу тела и заболеваемость. На обеих вирусных моделях В- и Т-клеточные ответы будут анализировать после и.н. антигенной стимуляции. Для исследований летального инфицирования инфекциями Eq/Lon авторы настоящего изобретения включают n=15 на группу (см. раздел «Позвоночные животные» предложения по анализу мощности). Для анализа мощности при вероятности выживаемости 0,6 (60%) в вакцинированной группе и 0,1 (10%) в контрольной группе для альфа 0,05 при мощности 0,8 и соотношения групп 1 требуется суммарный размер выборки 30 животных (по 15 на группу). После антигенной стимуляции за животными будут наблюдать дважды в день путем визуального наблюдения клинических признаков. Животных будут умерщвлять, когда они будут соответствовать следующим критериям: 1) невосприимчивость к внешней стимуляции, 2) прострация в течение >1 ч, 3) затрудненное дыхание, 4) постоянный тремор, или 5) постоянная сторбленность. Все наблюдения будут записывать. Животные, потерявшие >25% массы тела, будут исключены и при анализе выживаемости будут считаться не выжившими. Смерть не будет являться конечной точкой для данного исследования.

(IACUC (Institutional Animal Care and Use Committee, Институциональный комитет по содержанию и использованию животных) не позволяет использовать смерть в качестве конечной точки).

5 **Цель 4: Исследования токсикологии и безопасности**

Актуальность исследования: Хотя безопасность пустых наночастиц и наночастиц с пептидом инсулином была оценена в клинических исследованиях на человеке (предварительные исследования), безопасность НЧ с какими-либо антигенными эпитопами для людей ранее не исследовалась. Поскольку данные эпитопы являются специфичными к молекулам HLA-A2 и A24 человека и выполняют специфичные биологические функции, связанные с иммунными ответами человека, также важно оценить безопасность состава вакцины на соответствующей модели на животных. Как описано выше, модель трансгенных мышей HLA широко используют для оценки эффективности составов вакцины на основе эпитопов *in vivo*. С данной целью авторы настоящего изобретения оценят безопасность наночастиц с применением данных моделей на трансгенных мышах.

Методы: Составы вакцины на основе наночастиц будут вводить в различных дозах (до 10X дозы вакцины из цели 3) в течение 5 последовательных дней внутридермально, подкожно или внутривенно. Вводимый объем будет составлять 100 мкл/животное. Массу тела и потребление пищи будут контролировать в течение периодов времени длительностью 48 часов. Образцы мочи и фекалий будут отбирать в течение периодов времени 24 часа в различные временные точки в течение исследования, и суммарные образцы мочи и фекалий для каждого животного будут отбирать и взвешивать при комнатной температуре и хранить при температуре $-80 \pm 10^{\circ}\text{C}$. Образцы крови будут получать в заранее установленное время, собирать в пробирки с EDTA K3 и хранить на холодной бане до центрифугирования (3500 об./мин., 10 минут, 4°C). Полученную плазму будут замораживать при температуре $-80 \pm 10^{\circ}\text{C}$. После выделения крови животных будут умерщвлять для получения образцов следующих тканей: головной мозг, печень, почки, сердце, селезенка и

легкие. Образцы ткани будут взвешивать и быстро замораживать в жидком азоте, а затем хранить при температуре $-80 \pm 10^{\circ}\text{C}$. Будут проводить токсикологический анализ образцов крови и ткани, и все данные будут анализировать в отношении статистической значимости. Будут проводить химический анализ крови отобранных образцов крови. Будут оценивать маркеры функции печени (аланиновая трансаминаза, аспартатаминотрансфераза, альбумин, щелочная фосфатаза, общий и прямой билирубин, лактатдегидрогеназа), функции почек (азот мочевины крови, креатинин, мочевая кислота и общий белок) и функции сердца (аспартатаминотрансфераза и лактатдегидрогеназа). Помимо этого, в тест также будут включены панели маркеров аллергии (эозинофилы, глобулин, число лимфоцитов и моноцитов) и гематологических нарушений (гемоглобин, гематокрит, число ККК (красных клеток крови) и БКК (белых клеток крови)). Образцы ткани также будут исследовать в отношении накопления частиц золота методом трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ) (82, 83).

15

Перечень литературных источников

- 5 1. Neuzil KM. Influenza: New Insights Into an Old Disease. *Curr Infect Dis Rep.* 2000;2(3):224-30. PubMed PMID: 11095860.
2. Mullooly JP, Bennett MD, Hornbrook MC, Barker WH, Williams WW, Patriarca PA, et al. Influenza vaccination programs for elderly persons: cost-effectiveness in a health maintenance organization. *Ann Intern Med.* 1994;121(12):947-52. PubMed PMID: 7978721.
- 10 3. Hensley SE, Pinto AK, Hickman HD, Kastenmayer RJ, Bennink JR, Virgin HW, et al. Murine norovirus infection has no significant effect on adaptive immunity to vaccinia virus or influenza A virus. *J Virol.* 2009;83(14):7357-60. PubMed PMID: 19403665.
4. Murphy BR, Nelson DL, Wright PF, Tierney EL, Phelan MA, Chanock RM.
- 15 Secretary and systemic immunological response in children infected with live attenuated influenza A virus vaccines. *Infect Immun.* 1982;36(3):1102-8. PubMed PMID: 7095844.
5. Burlington DB, Clements ML, Meiklejohn G, Phelan M, Murphy BR.
- Hemagglutinin-specific antibody responses in immunoglobulin G, A, and M isotypes as measured by enzyme-linked immunosorbent assay after primary or secondary infection of
- 20 humans with influenza A virus. *Infect Immun.* 1983;41(2):540-5. PubMed PMID: 6874068.
6. Subbarao K, Murphy BR, Fauci AS. Development of effective vaccines against pandemic influenza. *Immunity.* 2006;24(1):5-9. PubMed PMID: 16413916.
7. Johansson BE, Bucher DJ, Kilbourne ED. Purified influenza virus hemagglutinin
- 25 and neuraminidase are equivalent in stimulation of antibody response but induce contrasting types of immunity to infection. *J Virol.* 1989;63(3):1239-46. PubMed PMID: 2915381.
8. Paul WE, Benacerraf B. Functional specificity of thymus- dependent lymphocytes. *Science.* 1977;195(4284):1293-300. PubMed PMID: 320663.
- 30 9. Shedlock DJ, Shen H. Requirement for CD4 T cell help in generating functional CD8 T cell memory. *Science.* 2003;300(5617):337-9. PubMed PMID: 12690201.

10. Ngo-Giang-Huong N, Candotti D, Goubar A, Autran B, Maynard M, Sicard D, et al. HIV type 1-specific IgG2 antibodies: markers of helper T cell type 1 response and prognostic marker of long-term nonprogression. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2001;17(15):1435-46. PubMed PMID: 11679156.
- 5 11. Heeney JL. Requirement of diverse T-helper responses elicited by HIV vaccines: induction of highly targeted humoral and CTL responses. *Expert Rev Vaccines*. 2004;3(4 Suppl):S53-64. PubMed PMID: 15285705.
12. Novak EJ, Liu AW, Nepom GT, Kwok WW. MHC class II tetramers identify peptide-specific human CD4(+) T cells proliferating in response to influenza A antigen. *J Clin Invest*. 1999;104(12):R63-7. PubMed PMID: 10606632.
- 10 13. Kamperschroer C, Dibble JP, Meents DL, Schwartzberg PL, Swain SL. SAP is required for Th cell function and for immunity to influenza. *J Immunol*. 2006;177(8):5317-27. PubMed PMID: 17015717.
14. Marshall D, Sealy R, Sangster M, Coleclough C. TH cells primed during influenza virus infection provide help for qualitatively distinct antibody responses to subsequent immunization. *J Immunol*. 1999;163(9):4673-82. PubMed PMID: 10528164.
- 15 15. McMichael AJ, Gotch FM, Noble GR, Beare PA. Cytotoxic T-cell immunity to influenza. *N Engl J Med*. 1983;309(1):13-7. PubMed PMID: 6602294.
16. De Groot AS, Ardito M, McClaine EM, Moise L, Martin WD. Immunoinformatic comparison of T-cell epitopes contained in novel swine-origin influenza A (H1N1) virus with epitopes in 2008-2009 conventional influenza vaccine. *Vaccine*. 2009;27(42):5740-7. PubMed PMID: 19660593.
- 20 17. Greenbaum J. <http://iedb.zendesk.com/forums/45499/entries/35037> Knowledgebase and Forums / Epitope analysis in emerging H1N1 swine flu viruses / Analysis version 1.0) 2009.
- 25 18. Kilbourne ED. What are the prospects for a universal influenza vaccine? *Nat Med*. 1999;5(10):1119-20. PubMed PMID: 10502805.
19. Choppin PW, Tamm I. Studies of two kinds of virus particles which comprise influenza A2 virus strains. II. Reactivity with virus inhibitors in normal sera. *J Exp Med*. 30 1960;112:921-44. PubMed PMID: 13693272.

20. Epstein SL, Mispion JA, Lawson CM, Subbarao EK, Connors M, Murphy BR. Beta 2-microglobulin-deficient mice can be protected against influenza A infection by vaccination with vaccinia-influenza recombinants expressing hemagglutinin and neuraminidase. *J Immunol.* 1993;150(12):5484-93. PubMed PMID: 8390536.
- 5 21. Price GE, Ou R, Jiang H, Huang L, Moskophidis D. Viral escape by selection of cytotoxic T cell-resistant variants in influenza A virus pneumonia. *J Exp Med.* 2000;191(11):1853-67. PubMed PMID: 10839802.
22. Woodland DL, Hogan RJ, Zhong W. Cellular immunity and memory to respiratory virus infections. *Immunol Res.* 2001;24(1):53-67. PubMed PMID: 11485209.
- 10 23. Boon AC, de Mutsert G, Graus YM, Fouchier RA, Sintnicolaas K, Osterhaus AD, et al. Sequence variation in a newly identified HLA-B35-restricted epitope in the influenza A virus nucleoprotein associated with escape from cytotoxic T lymphocytes. *J Virol.* 2002;76(5):2567-72. PubMed PMID: 11836437.
24. Ben-Yedidia T, Marcus H, Reisner Y, Arnon R. Intranasal administration of peptide vaccine protects human/mouse radiation chimera from influenza infection. *Int Immunol.* 1999;11(7):1043-51. PubMed PMID: 10383936.
- 15 25. Jameson J, Cruz J, Ennis FA. Human cytotoxic T-lymphocyte repertoire to influenza A viruses. *J Virol.* 1998;72(11):8682-9. PubMed PMID: 9765409.
26. Kanekiyo M, Wei CJ, Yassine HM, McTamney PM, Boyington JC, Whittle JR, et al. Self-assembling influenza nanoparticle vaccines elicit broadly neutralizing H1N1 antibodies. *Nature.* 2013;499(7456):102-6. Epub 2013/05/24. doi: 10.1038/nature12202. PubMed PMID: 23698367.
- 20 27. Pleguezuelos O, Robinson S, Stoloff GA, Caparros-Wanderley W. Synthetic Influenza vaccine (FLU-v) stimulates cell mediated immunity in a double-blind, randomised, placebo-controlled Phase I trial. *Vaccine.* 2012;30(31):4655-60. Epub 2012/05/12. doi: 10.1016/j.vaccine.2012.04.089. PubMed PMID: 22575166.
- 25 28. Wilkinson TM, Li CK, Chui CS, Huang AK, Perkins M, Liebner JC, et al. Preexisting influenza-specific CD4+ T cells correlate with disease protection against influenza challenge in humans. *Nat Med.* 2012;18(2):274-80. Epub 2012/01/31. doi: 10.1038/nm.2612. PubMed PMID: 22286307.
- 30

29. Atsmon J, Kate-Ilovitz E, Shaikevich D, Singer Y, Volokhov I, Haim KY, et al. Safety and immunogenicity of multimeric-001--a novel universal influenza vaccine. *Journal of clinical immunology*. 2012;32(3):595-603. Epub 2012/02/10. doi: 10.1007/s10875-011-9632-5. PubMed PMID: 22318394.
- 5 30. Tao W, Ziemer KS, Gill HS. Gold nanoparticle-M2e conjugate coformulated with CpG induces protective immunity against influenza A virus. *Nanomedicine (Lond)*. 2013. Epub 2013/07/09. doi: 10.2217/nnm.13.58. PubMed PMID: 23829488.
31. Testa JS, Philip R. Role of T-cell epitope-based vaccine in prophylactic and therapeutic applications. *Future virology*. 2012;7(11):1077-88. Epub 2013/05/01. doi: 10.2217/fvl.12.108. PubMed PMID: 23630544; PubMed Central PMCID: PMC3636528.
- 10 32. Fifis T, Gamvrellis A, Crimeen-Irwin B, Pietersz GA, Li J, Mottram PL, et al. Size-dependent immunogenicity: therapeutic and protective properties of nano-vaccines against tumors. *J Immunol*. 2004;173(5):3148-54. PubMed PMID: 15322175.
33. Reddy ST, van der Vlies AJ, Simeoni E, Angeli V, Randolph GJ, O'Neil CP, et al. Exploiting lymphatic transport and complement activation in nanoparticle vaccines. *Nat Biotechnol*. 2007;25(10):1159-64. PubMed PMID: 17873867.
- 15 34. Testa JS, Shetty V, Hafner J, Nickens Z, Kamal S, Sinnathamby G, et al. MHC class I-presented T cell epitopes identified by immunoproteomics analysis are targets for a cross reactive influenza-specific T cell response. *PLoS One*. 2012;7(11):e48484. Epub 2012/11/13. doi: 10.1371/journal.pone.0048484. PubMed PMID: 23144892; PubMed Central PMCID: PMC3492461.
- 20 35. Ojeda R, de Paz JL, Barrientos AG, Martin-Lomas M, Penades S. Preparation of multifunctional glyconanoparticles as a platform for potential carbohydrate-based anticancer vaccines. *Carbohydr Res*. 2007;342(3-4):448-59. PubMed PMID: 17173881.
- 25 36. Kircheis R, Vondru P, Zinocker I, Haring D, Nechansky A, Loibner H, et al. Immunization of Rhesus monkeys with the conjugate vaccine IGN402 induces an IgG immune response against carbohydrate and protein antigens, and cancer cells. *Vaccine*. 2006;24(13):2349-57. PubMed PMID: 16406172.
- 30 37. Beyer M, Schultze JL. Immunoregulatory T cells: role and potential as a target in malignancy. *Curr Oncol Rep*. 2008;10(2):130-6. PubMed PMID: 18377826.

38. Dredge K, Marriott JB, Todryk SM, Dalglish AG. Adjuvants and the promotion of Th1-type cytokines in tumour immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother.* 2002;51(10):521-31. PubMed PMID: 12384803.
39. Thomas PG, Brown SA, Keating R, Yue W, Morris MY, So J, et al. Hidden epitopes emerge in secondary influenza virus-specific CD8+ T cell responses. *J Immunol.* 2007;178(5):3091-8. PubMed PMID: 17312156.
40. Huang Q, Liu D, Majewski P, Schulte LC, Korn JM, Young RA, et al. The plasticity of dendritic cell responses to pathogens and their components. *Science.* 2001;294(5543):870-5. PubMed PMID: 11679675.
41. Fonteneau JF, Gilliet M, Larsson M, Dasilva I, Munz C, Liu YJ, et al. Activation of influenza virus-specific CD4+ and CD8+ T cells: a new role for plasmacytoid dendritic cells in adaptive immunity. *Blood.* 2003;101(9):3520-6. PubMed PMID: 12511409.
42. Man S, Newberg MH, Crotzer VL, Luckey CJ, Williams NS, Chen Y, et al. Definition of a human T cell epitope from influenza A non-structural protein 1 using HLA-A2.1 transgenic mice. *Int Immunol.* 1995;7(4):597-605. Epub 1995/04/01. PubMed PMID: 7547687.
43. Gras S, Kedzierski L, Valkenburg SA, Laurie K, Liu YC, Denholm JT, et al. Cross-reactive CD8+ T-cell immunity between the pandemic H1N1-2009 and H1N1-1918 influenza A viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(28):12599-604. Epub 2010/07/10. doi: 10.1073/pnas.1007270107. PubMed PMID: 20616031; PubMed Central PMCID: PMC2906563.
44. Mittendorf EA, Storrer CE, Shriver CD, Ponniah S, Peoples GE. Evaluation of the CD107 cytotoxicity assay for the detection of cytolytic CD8+ cells recognizing HER2/neu vaccine peptides. *Breast cancer research and treatment.* 2005;92(1):85-93. Epub 2005/06/28. doi: 10.1007/s10549-005-0988-1. PubMed PMID: 15980996.
45. Betts MR, Brenchley JM, Price DA, De Rosa SC, Douek DC, Roederer M, et al. Sensitive and viable identification of antigen-specific CD8+ T cells by a flow cytometric assay for degranulation. *J Immunol Methods.* 2003;281(1-2):65-78. Epub 2003/10/29. PubMed PMID: 14580882.

46. Fiers W, De Filette M, Birkett A, Neiryck S, Min Jou W. A "universal" human influenza A vaccine. *Virus research*. 2004;103(1-2):173-6. Epub 2004/05/28. doi: 10.1016/j.virusres.2004.02.030. PubMed PMID: 15163506.
47. Grandea AG, 3rd, Olsen OA, Cox TC, Renshaw M, Hammond PW, Chan-Hui PY, et al. Human antibodies reveal a protective epitope that is highly conserved among human and nonhuman influenza A viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(28):12658-63. Epub 2010/07/10. doi: 10.1073/pnas.0911806107. PubMed PMID: 20615945; PubMed Central PMCID: PMC2906546.
48. Wherry EJ, Puorro KA, Porgador A, Eisenlohr LC. The induction of virus-specific CTL as a function of increasing epitope expression: responses rise steadily until excessively high levels of epitope are attained. *J Immunol*. 1999;163(7):3735-45. PubMed PMID: 10490969.
49. Ramakrishna V, Ross M, Petersson M, Gatlin C, Lyons C, Miller C, et al. Naturally occurring peptides associated with HLA-A2 in ovarian cancer cell lines identified by mass spectrometry are targets of HLA-A2-restricted cytotoxic T cells. *Int Immunol*. 2003;15(6).
50. Philip R, Murthy S, Krakover J, Sinnathamby G, Zerfass J, Keller L, et al. Shared immunoproteome for ovarian cancer diagnostics and immunotherapy: potential theranostic approach to cancer. *J Proteome Res*. 2007;6(7):2509-17. PubMed PMID: 17547437.
51. Sinnathamby G, Lauer, P., Zerfass, J., Hanson, B., Karabudak, A., Krakover, J., Secord, A.A., Clay, T.M., Morse, M.A., Dubensky, T.W., Brockstedt D.G., Philip, R., and Giedlin, M. Priming and Activation of human ovarian and breast cancer-specific CD8⁺ T cells by polyvalent *Listeria monocytogenes*-based vaccines. *J Immunotherapy*. 2009;32(8):856-69.
52. Karkada M, Weir, G.M., Quinton, T., Sammatur, L., MacDonald, L.D., Grant, A., Liwski, R., Juskevicius, R., Sinnathamby, G., Phillip, R., Mansour, M. A Novel Breast/Ovarian Cancer Peptide Vaccine Platform that Promotes Specific Type-1 but not Treg/Tr1-Type Responses *J Immunotherapy*. 2009:in press.
53. Morse MA, Alvarez Secord A, Blackwell KL, Hobeika A, Sinnathamby G, Osada T, et al. MHC class I-presented tumor antigens identified in ovarian cancer by immunoproteomic analysis are targets for T cell responses against breast and ovarian cancer. *Clin Cancer Res*. PubMed PMID: 21300761.

54. Shetty V, Sinnathamby G, Nickens Z, Shah P, Hafner J, Mariello L, et al. MHC class I-presented lung cancer-associated tumor antigens identified by immunoproteomics analysis are targets for cancer-specific T cell response. *J Proteomics*. 74(5):728-43. PubMed PMID: 21362506.
- 5 55. Testa JS, Shetty V, Sinnathamby G, Nickens Z, Hafner J, Kamal S, et al. Conserved MHC class I-presented dengue virus epitopes identified by immunoproteomics analysis are targets for cross-serotype reactive T-cell response. *J Infect Dis*. 2012;205(4):647-55. Epub 2012/01/17. doi: 10.1093/infdis/jir814. PubMed PMID: 22246683.
- 10 56. Meidenbauer N, Marienhagen J, Laumer M, Vogl S, Heymann J, Andreesen R, et al. Survival and tumor localization of adoptively transferred Melan-A-specific T cells in melanoma patients. *J Immunol*. 2003;170(4):2161-9. PubMed PMID: 12574389.
57. Batard P, Peterson DA, Devevre E, Guillaume P, Cerottini JC, Rimoldi D, et al. Dextramers: new generation of fluorescent MHC class I/peptide multimers for
15 visualization of antigen-specific CD8⁺ T cells. *J Immunol Methods*. 2006;310(1-2):136-48. PubMed PMID: 16516226.
58. Ramakrishna V, Ross MM, Petersson M, Gatlin CC, Lyons CE, Miller CL, et al. Naturally occurring peptides associated with HLA-A2 in ovarian cancer cell lines identified by mass spectrometry are targets of HLA-A2-restricted cytotoxic T cells. *Int*
20 *Immunol*. 2003;15(6):751-63. PubMed PMID: 12750359.
59. Morse MA, Nair SK, Mosca PJ, Hobeika AC, Clay TM, Deng Y, et al. Immunotherapy with autologous, human dendritic cells transfected with carcinoembryonic antigen mRNA. *Cancer Invest*. 2003;21(3):341-9. PubMed PMID: 12901279.
60. Doherty PC, Allan W, Eichelberger M, Carding SR. Roles of alpha beta and
25 gamma delta T cell subsets in viral immunity. *Annu Rev Immunol*. 1992;10:123-51. PubMed PMID: 1534240.
61. Eichelberger M, Allan W, Zijlstra M, Jaenisch R, Doherty PC. Clearance of influenza virus respiratory infection in mice lacking class I major histocompatibility complex-restricted CD8⁺ T cells. *J Exp Med*. 1991;174(4):875-80. PubMed PMID:
30 1919440.

62. Epstein SL, Lo CY, Mispelon JA, Bennink JR. Mechanism of protective immunity against influenza virus infection in mice without antibodies. *J Immunol.* 1998;160(1):322-7. PubMed PMID: 9551987.
63. Graham MB, Braciale TJ. Resistance to and recovery from lethal influenza virus infection in B lymphocyte-deficient mice. *J Exp Med.* 1997;186(12):2063-8. PubMed PMID: 9396777.
64. Rimmelzwaan GF, Osterhaus AD. Cytotoxic T lymphocyte memory: role in cross-protective immunity against influenza? *Vaccine.* 1995;13(8):703-5. PubMed PMID: 7483784.
65. Yewdell JW, Bennink JR, Smith GL, Moss B. Influenza A virus nucleoprotein is a major target antigen for cross-reactive anti-influenza A virus cytotoxic T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1985;82(6):1785-9. PubMed PMID: 3872457.
66. Tan PT, Khan AM, August JT. Highly conserved influenza A sequences as T cell epitopes-based vaccine targets to address the viral variability. *Hum Vaccin.* 2011;7(4):402-9. Epub 2011/04/08. PubMed PMID: 21471731.
67. Yap KL, Braciale TJ, Ada GL. Role of T-cell function in recovery from murine influenza infection. *Cell Immunol.* 1979;43(2):341-51. PubMed PMID: 113108.
68. Yap KL, Ada GL, McKenzie IF. Transfer of specific cytotoxic T lymphocytes protects mice inoculated with influenza virus. *Nature.* 1978;273(5659):238-9. PubMed PMID: 306072.
69. Stambas J, Guillonneau C, Kedzierska K, Minter JD, Doherty PC, La Gruta NL. Killer T cells in influenza. *Pharmacology & therapeutics.* 2008;120(2):186-96. Epub 2008/09/20. doi: 10.1016/j.pharmthera.2008.08.007. PubMed PMID: 18801385.
70. Sun J, Madan R, Karp CL, Braciale TJ. Effector T cells control lung inflammation during acute influenza virus infection by producing IL-10. *Nat Med.* 2009;15(3):277-84. Epub 2009/02/24. doi: 10.1038/nm.1929. PubMed PMID: 19234462; PubMed Central PMCID: PMC2693210.
71. McKinstry KK, Strutt TM, Swain SL. Hallmarks of CD4 T cell immunity against influenza. *Journal of internal medicine.* 2011;269(5):507-18. Epub 2011/03/03. doi: 10.1111/j.1365-2796.2011.02367.x. PubMed PMID: 21362069; PubMed Central PMCID: PMC3395075.

72. Richards KA, Topham D, Chaves FA, Sant AJ. Cutting edge: CD4 T cells generated from encounter with seasonal influenza viruses and vaccines have broad protein specificity and can directly recognize naturally generated epitopes derived from the live pandemic H1N1 virus. *J Immunol*. 2010;185(9):4998-5002. Epub 2010/10/05. doi: 10.4049/jimmunol.1001395. PubMed PMID: 20889549.
73. Lee LY, Ha do LA, Simmons C, de Jong MD, Chau NV, Schumacher R, et al. Memory T cells established by seasonal human influenza A infection cross-react with avian influenza A (H5N1) in healthy individuals. *J Clin Invest*. 2008;118(10):3478-90. Epub 2008/09/20. doi: 10.1172/JCI32460. PubMed PMID: 18802496; PubMed Central PMCID: PMC2542885.
74. Roti M, Yang J, Berger D, Huston L, James EA, Kwok WW. Healthy human subjects have CD4+ T cells directed against H5N1 influenza virus. *J Immunol*. 2008;180(3):1758-68. Epub 2008/01/23. PubMed PMID: 18209073; PubMed Central PMCID: PMC3373268.
75. Kreijtz JH, Bodewes R, van Amerongen G, Kuiken T, Fouchier RA, Osterhaus AD, et al. Primary influenza A virus infection induces cross-protective immunity against a lethal infection with a heterosubtypic virus strain in mice. *Vaccine*. 2007;25(4):612-20. PubMed PMID: 17005299.
76. Boesteanu AC, Babu NS, Wheatley M, Papazoglou ES, Katsikis PD. Biopolymer encapsulated live influenza virus as a universal CD8+ T cell vaccine against influenza virus. *Vaccine*. 2010;29(2):314-22. Epub 2010/11/03. doi: 10.1016/j.vaccine.2010.10.036. PubMed PMID: 21034826; PubMed Central PMCID: PMC3004745.
77. Manicassamy B, Manicassamy S, Belicha-Villanueva A, Pisanelli G, Pulendran B, Garcia-Sastre A. Analysis of in vivo dynamics of influenza virus infection in mice using a GFP reporter virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(25):11531-6. Epub 2010/06/11. doi: 10.1073/pnas.0914994107. PubMed PMID: 20534532; PubMed Central PMCID: PMC2895123.
78. Fukushi M, Ito T, Oka T, Kitazawa T, Miyoshi-Akiyama T, Kirikae T, et al. Serial histopathological examination of the lungs of mice infected with influenza A virus PR8 strain. *PLoS One*. 2011;6(6):e21207. Epub 2011/06/28. doi:

10.1371/journal.pone.0021207. PubMed PMID: 21701593; PubMed Central PMCID: PMC3118813.

79. Shirey KA, Lai W, Scott AJ, Lipsky M, Mistry P, Pletneva LM, et al. The TLR4 antagonist Eritoran protects mice from lethal influenza infection. *Nature*. 2013;497(7450):498-502. Epub 2013/05/03. doi: 10.1038/nature12118. PubMed PMID: 23636320.
80. Kawaoka Y. Equine H7N7 influenza A viruses are highly pathogenic in mice without adaptation: potential use as an animal model. *J Virol*. 1991;65(7):3891-4. PubMed PMID: 2041098.
- 10 81. Christensen JP, Doherty PC, Branum KC, Riberdy JM. Profound protection against respiratory challenge with a lethal H7N7 influenza A virus by increasing the magnitude of CD8(+) T-cell memory. *J Virol*. 2000;74(24):11690-6. PubMed PMID: 11090168.
82. Brandenberger C, Rothen-Rutishauser B, Muhlfeld C, Schmid O, Ferron GA, Maier KL, et al. Effects and uptake of gold nanoparticles deposited at the air-liquid
15 interface of a human epithelial airway model. *Toxicol Appl Pharmacol*. 242(1):56-65. PubMed PMID: 19796648.
83. Ubaldi C, Bonacchi D, Lorenzi G, Hermanns MI, Pohl C, Baldi G, et al. Gold nanoparticles induce cytotoxicity in the alveolar type-II cell lines A549 and NCIH441. *Part Fibre Toxicol*. 2009;6:18. PubMed PMID: 19545423

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Композиция вакцины, содержащая пептид вируса гриппа, который содержит CD8+ Т-клеточный эпитоп, и пептид вируса гриппа, который содержит В-клеточный эпитоп, причем каждый пептид присоединен к наночастице.
2. Композиция вакцины по п. 1, характеризующаяся тем, что указанная наночастица представляет собой наночастицу золота, наночастицу фосфата кальция или наночастицу кремния.
3. Композиция вакцины по п. 1 или 2, характеризующаяся тем, что указанный пептид вируса гриппа, который содержит CD8+ Т-клеточный эпитоп, и указанный пептид вируса гриппа, который содержит В-клеточный эпитоп, присоединены к одной и той же наночастице.
4. Композиция вакцины по любому из предшествующих пунктов, характеризующаяся тем, что указанный пептид вируса гриппа, который содержит CD8+ Т-клеточный эпитоп, присоединен к наночастице линкером, и/или указанный пептид вируса гриппа, который содержит В-клеточный эпитоп, присоединен к наночастице линкером.
5. Композиция вакцины по любому из предшествующих пунктов, характеризующаяся тем, что указанный пептид вируса гриппа, который содержит CD8+ Т-клеточный эпитоп, содержит один или более пептидов, представленных в SEQ ID NO: 1 - 21.
6. Композиция вакцины по любому из предшествующих пунктов, характеризующаяся тем, что указанный В-клеточный эпитоп представляет собой эпитоп матриксного белка гриппа 2 (M2e).

7. Композиция вакцины, содержащая пептид вируса гриппа, который содержит один или более CD8+ Т-клеточных эпитопов, представленных в SEQ ID NO: 1 - 21, причем указанный пептид присоединен к наночастице.
- 5 8. Композиция вакцины по п. 7, характеризующаяся тем, что указанная наночастица представляет собой наночастицу золота, наночастицу фосфата кальция или наночастицу кремния.
9. Композиция вакцины по п. 8, характеризующаяся тем, что указанный пептид
- 10 вируса гриппа, который содержит CD8+ Т-клеточный эпитоп, присоединен к наночастице линкером.
10. Композиция вакцины по любому из предшествующих пунктов, которая содержит два или более пептидов вируса гриппа, причем все из них содержат разные
- 15 CD8+ Т-клеточные эпитопы.
11. Композиция вакцины по п. 10, характеризующаяся тем, что указанные два или более пептидов вируса гриппа представляют собой два или более пептидов, представленных в SEQ ID NO: 1 - 21.
- 20 12. Композиция вакцины по любому из предшествующих пунктов, дополнительно содержащая пептид вируса гриппа, который содержит CD4+ Т-клеточный эпитоп.
13. Композиция вакцины по п. 12, характеризующаяся тем, что указанный пептид
- 25 вируса гриппа, который содержит CD4+ Т-клеточный эпитоп, присоединен к наночастице.
14. Композиция вакцины по п. 13, характеризующаяся тем, что указанная наночастица, к которой присоединен пептид вируса гриппа, содержащий CD4+ Т-
- 30 клеточный эпитоп, представляет собой наночастицу золота, наночастицу фосфата кальция или наночастицу кремния.

15. Композиция вакцины по п. 13 или 14, характеризующаяся тем, что указанный пептид вируса гриппа, который содержит CD4+ Т-клеточный эпитоп, присоединен к наночастице линкером.
- 5
16. Композиция вакцины по любому из предшествующих пунктов, характеризующаяся тем, что указанный пептид вируса гриппа, который содержит CD8+ Т-клеточный эпитоп, дополнительно содержит CD4+ Т-клеточный эпитоп.
- 10 17. Композиция вакцины по п. 16, характеризующаяся тем, что указанный пептид вируса гриппа, который содержит CD8+ Т-клеточный эпитоп и CD4+ Т-клеточный эпитоп, содержит один или более пептидов, представленных в SEQ ID NO: 22 - 27.
- 15 18. Композиция вакцины по любому из предшествующих пунктов, которая содержит по меньшей мере два пептида вируса гриппа, содержащие CD8+ Т-клеточный эпитоп, причем все они взаимодействуют с различными супертипами HLA.
- 20 19. Композиция вакцины по любому из предшествующих пунктов, содержащая по меньшей мере один иммуногенный пептид, который взаимодействует по меньшей мере с двумя различными супертипами HLA.
- 25 20. Композиция вакцины по п. 18 или 19, характеризующаяся тем, что указанные по меньшей мере два различных супертипа HLA выбраны из HLA-A1, HLA-A2, HLA-A3, HLA-A24, HLA-B7, HLA-B8, HLA-B27, HLA-B44, HLA-B58 и HLA-B62.
- 30 21. Композиция вакцины по п. 20, характеризующаяся тем, что указанные по меньшей мере два различных супертипа HLA представляют собой HLA-A2 и HLA-A24.

22. Способ предотвращения или лечения инфекции вирусом гриппа, который включает введение композиции вакцины по любому из предшествующих пунктов индивидууму, инфицированному или подверженному риску инфицирования вирусом гриппа.

5

23. Способ по п. 22, характеризующийся тем, что указанный вирус гриппа представляет собой пандемический вирус гриппа.

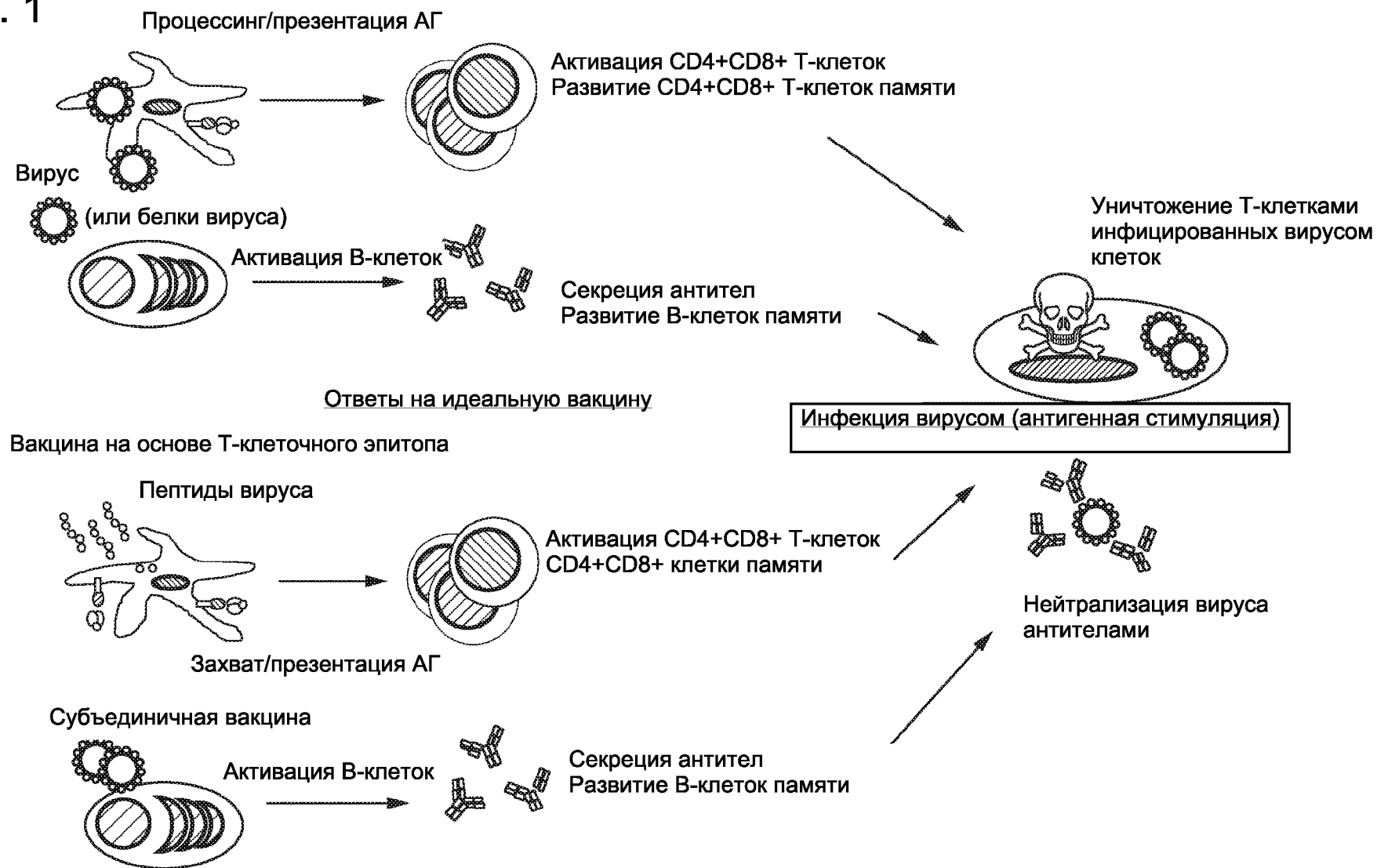
24. Композиция вакцины по любому из пп. 1 – 21 для применения в способе предотвращения или лечения инфекции вирусом гриппа у индивидуума.

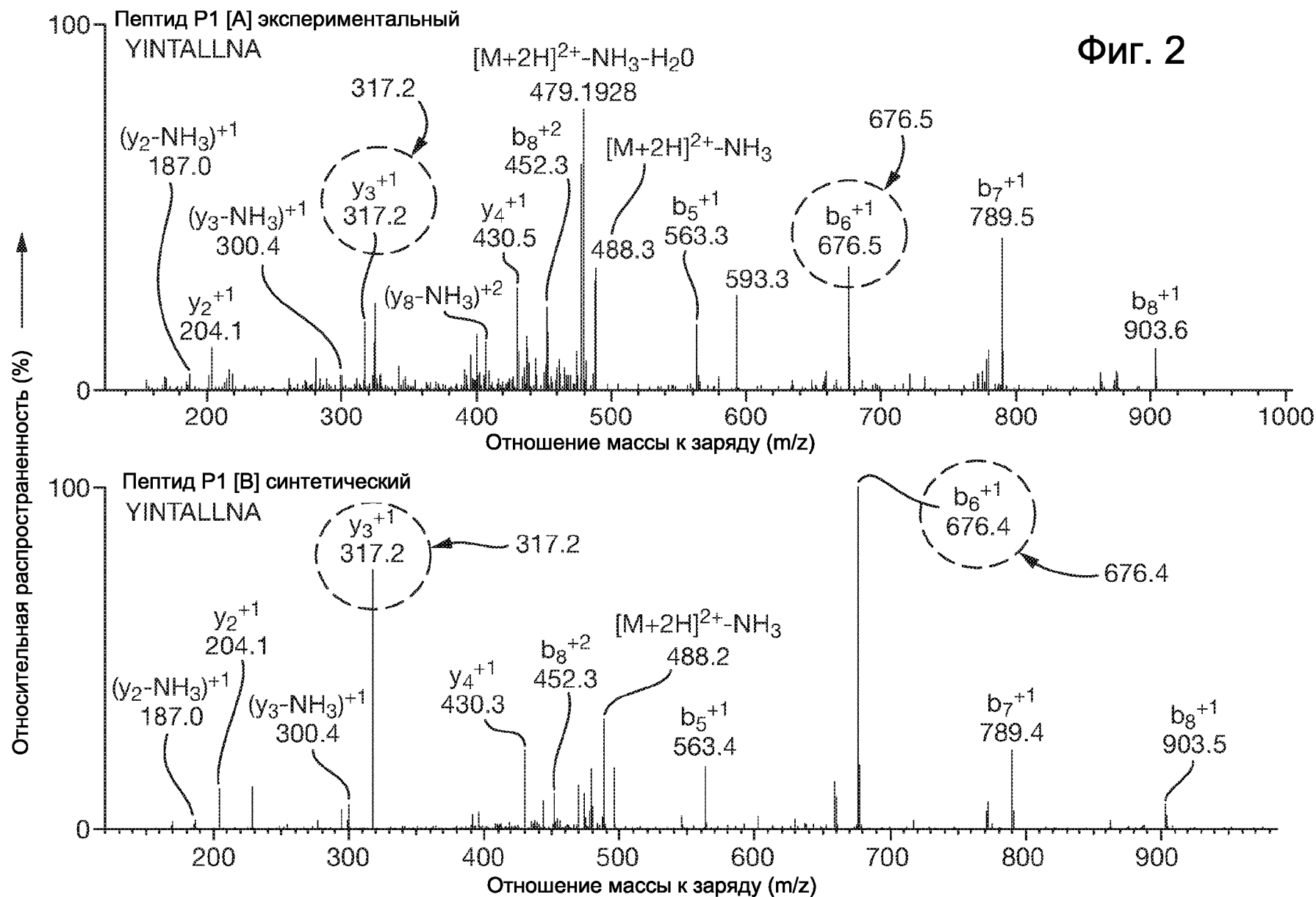
10

25. Композиция вакцины для применения по п. 24, характеризующаяся тем, что указанный вирус гриппа представляет собой пандемический вирус гриппа.

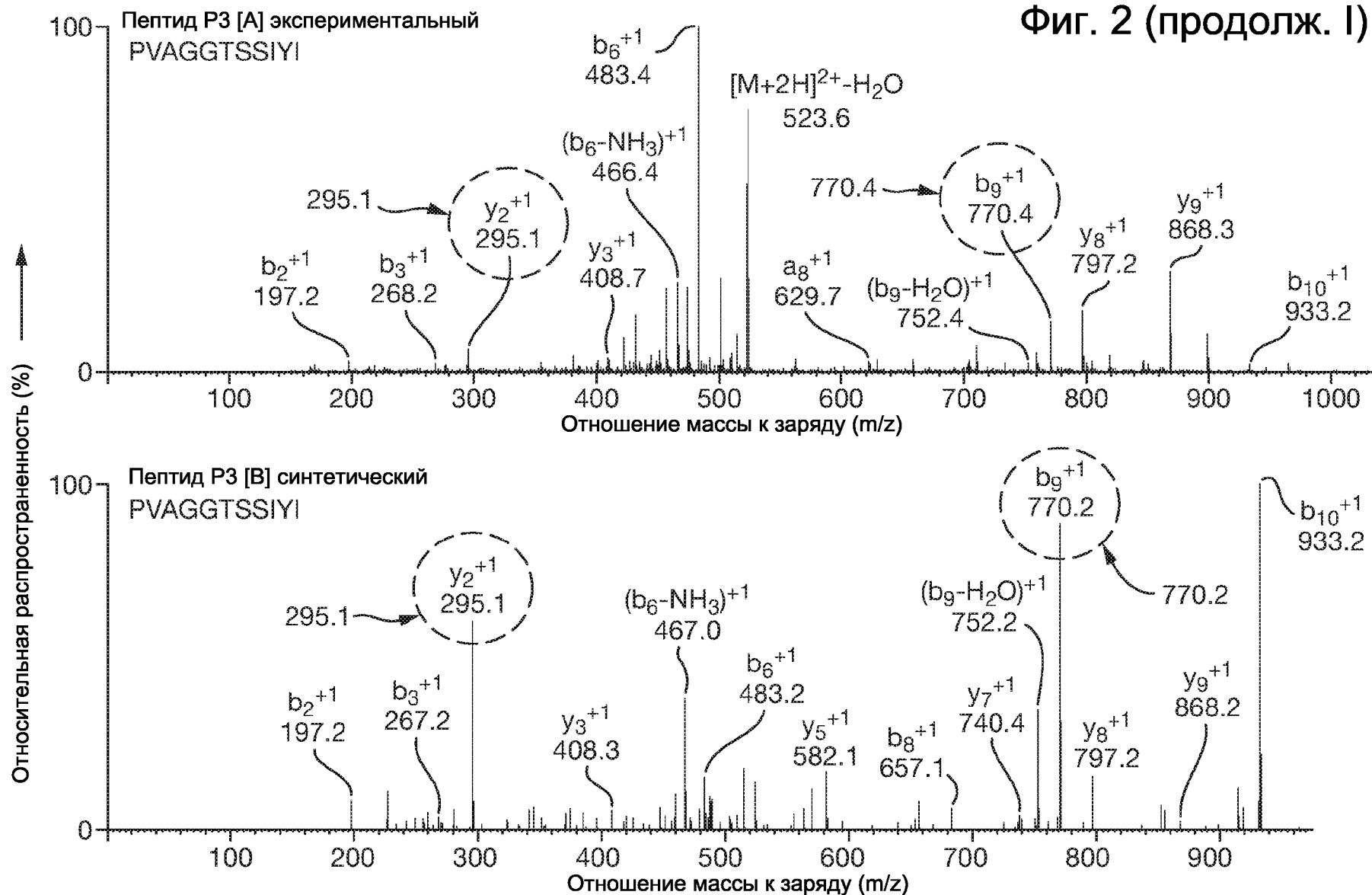
15

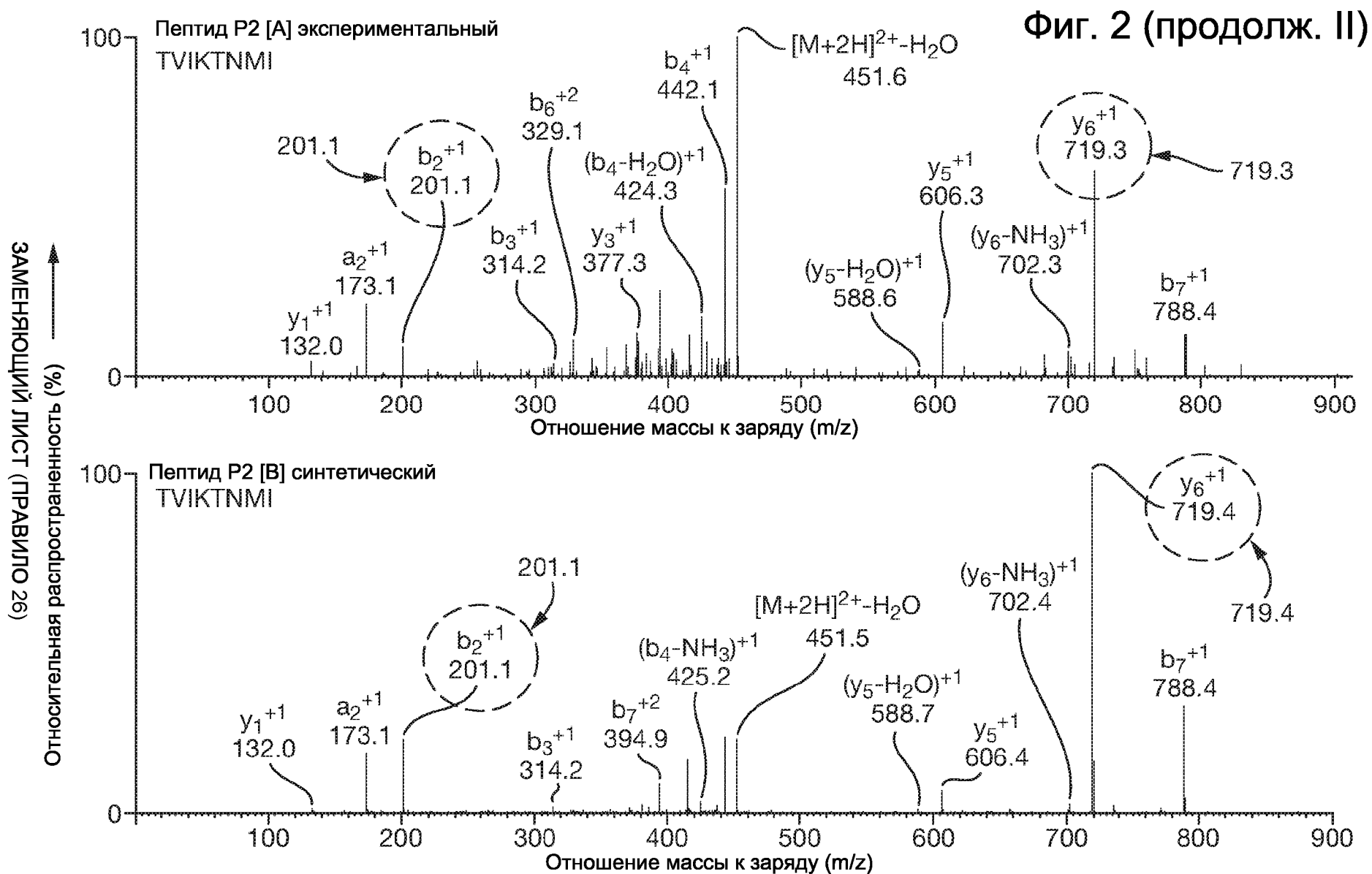
Фиг. 1

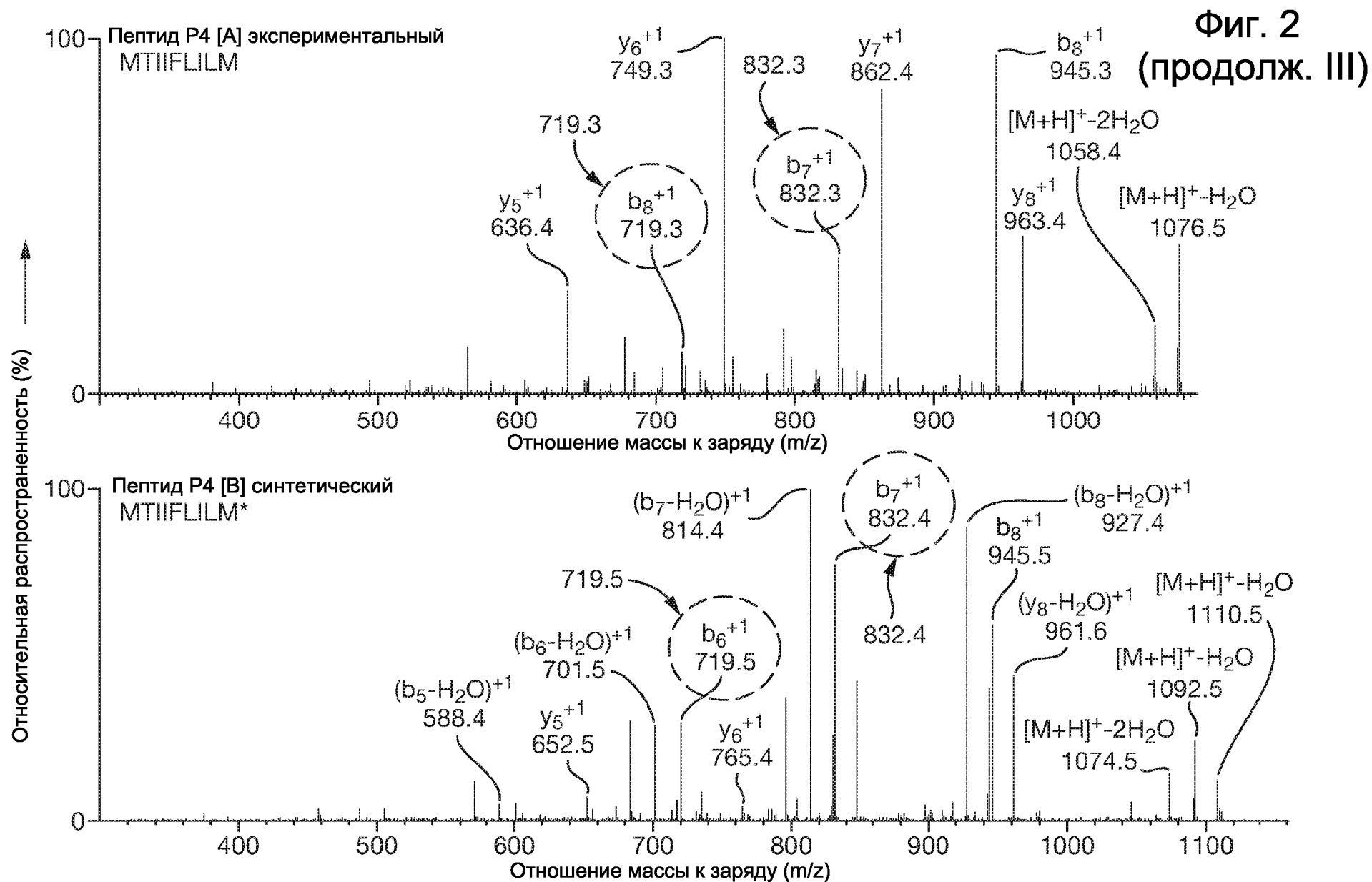




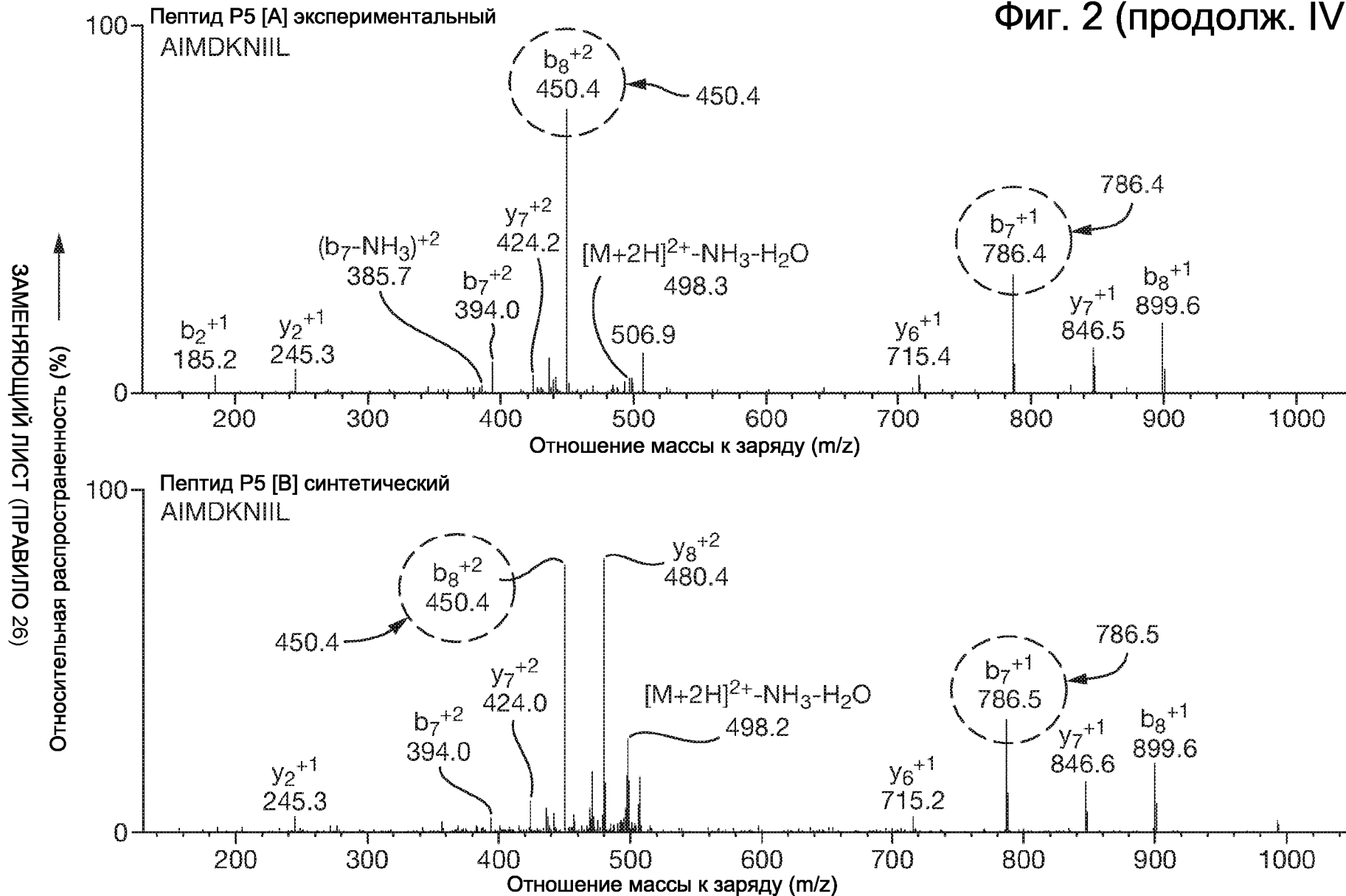
Фиг. 2 (продолж. I)



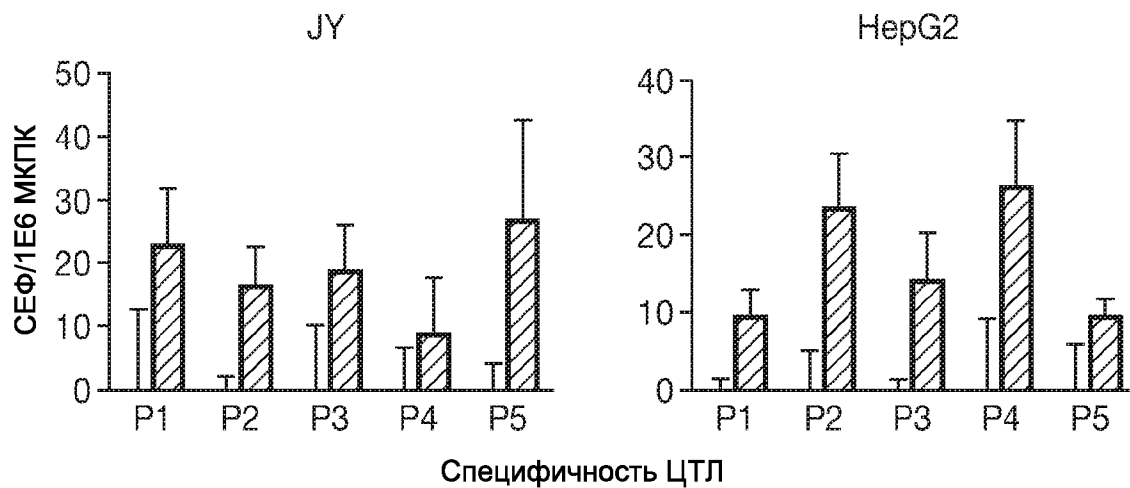




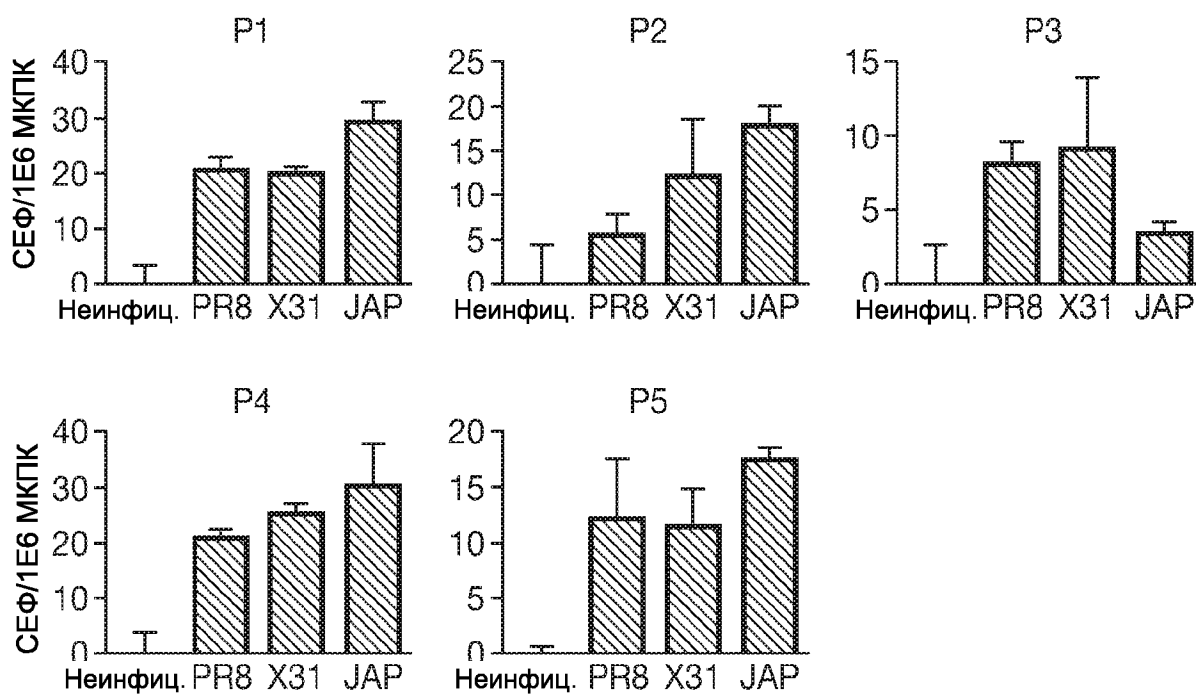
Фиг. 2 (продолж. IV)



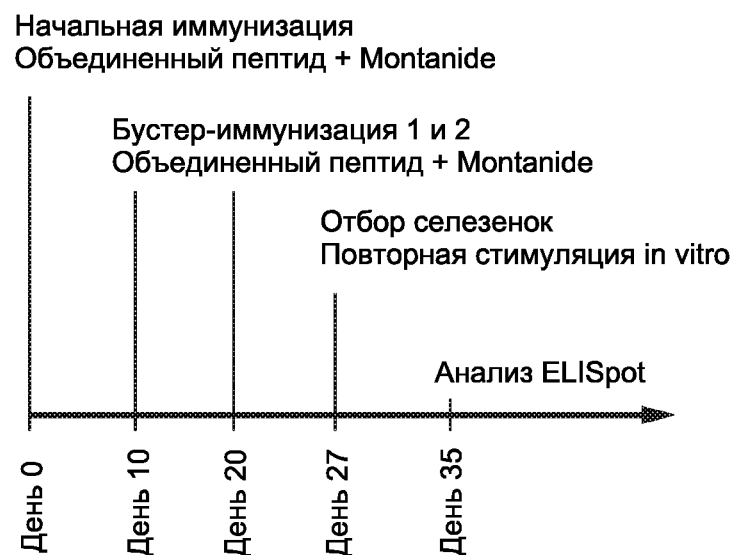
Фиг. 3А



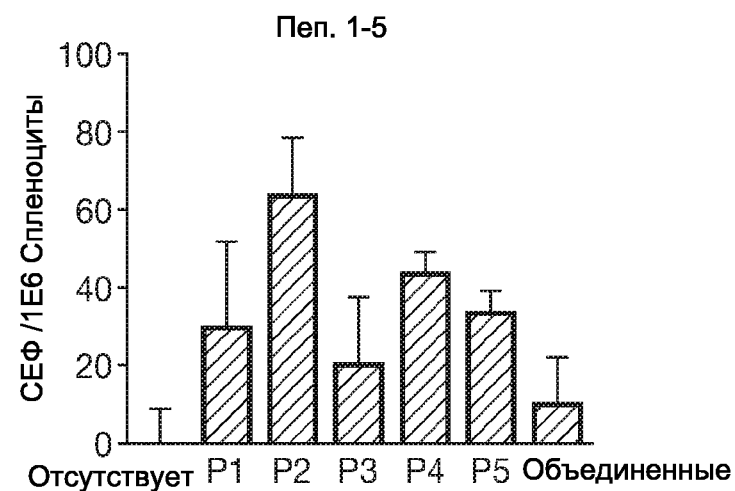
Фиг. 3В



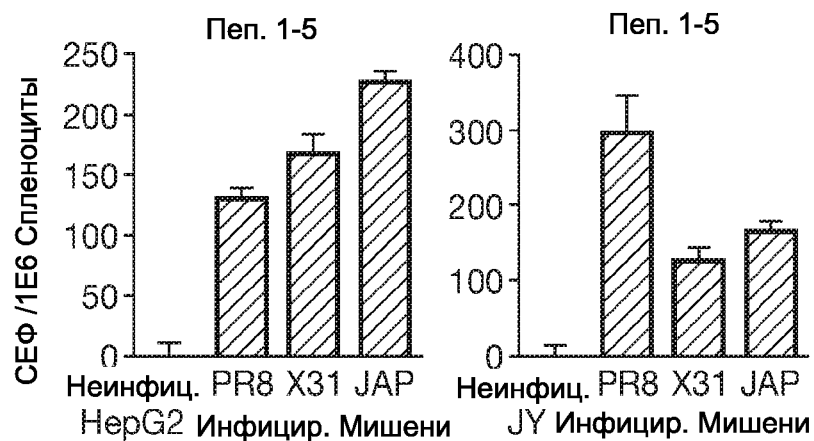
Фиг. 4А



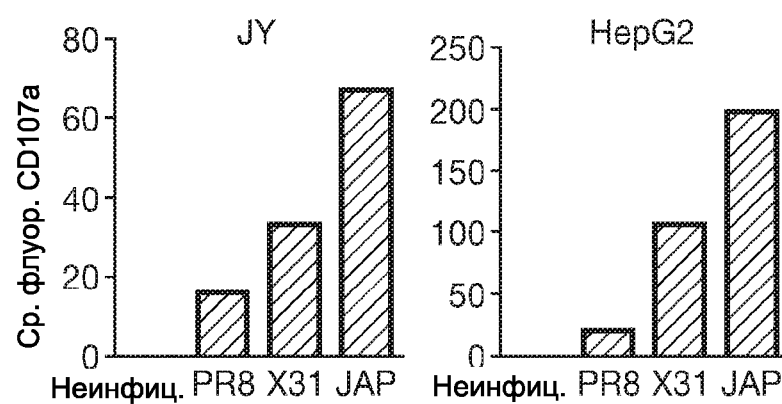
Фиг. 4В



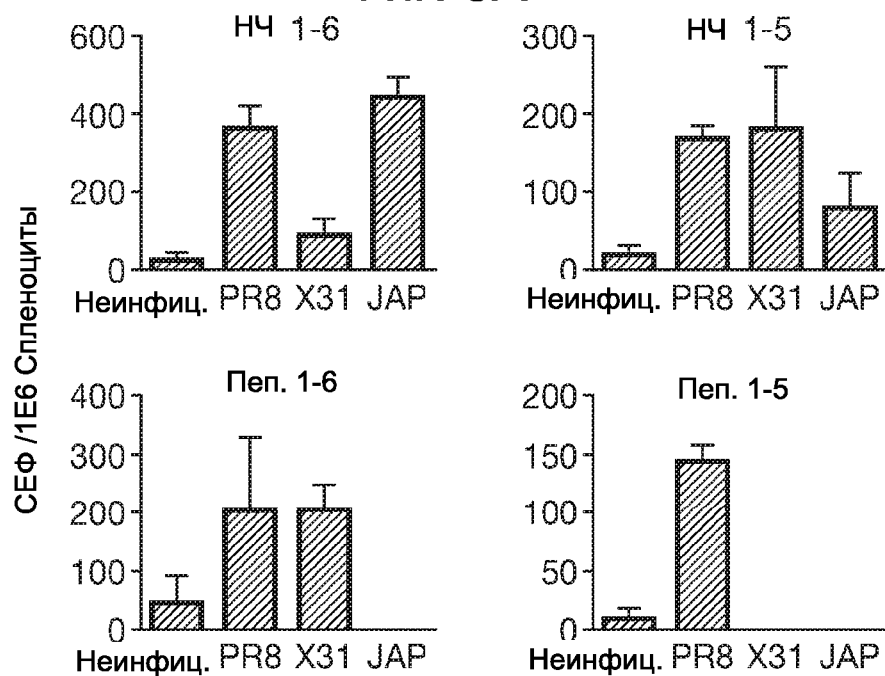
Фиг. 4С



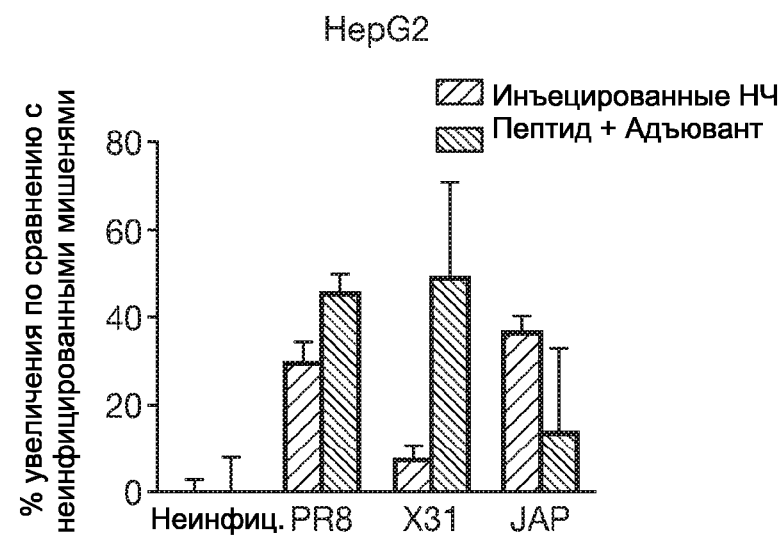
Фиг. 4D



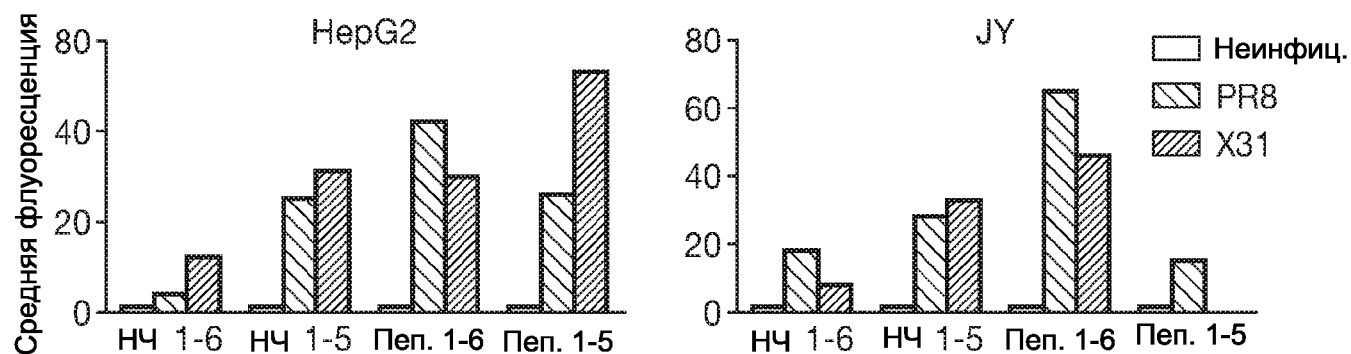
Фиг. 5А



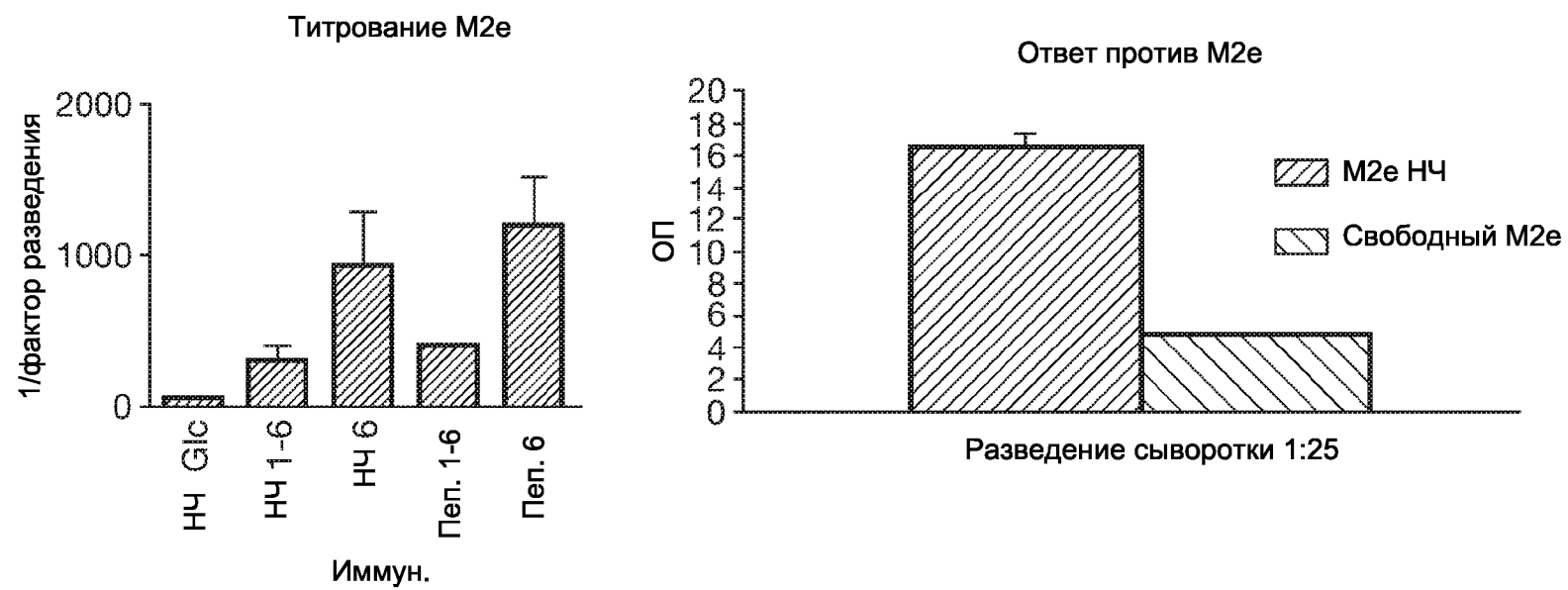
Фиг. 5В



Фиг. 5С

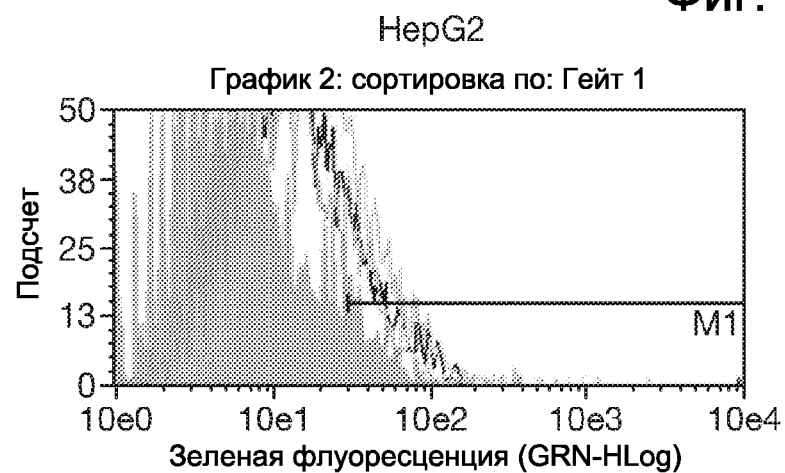


Фиг. 6

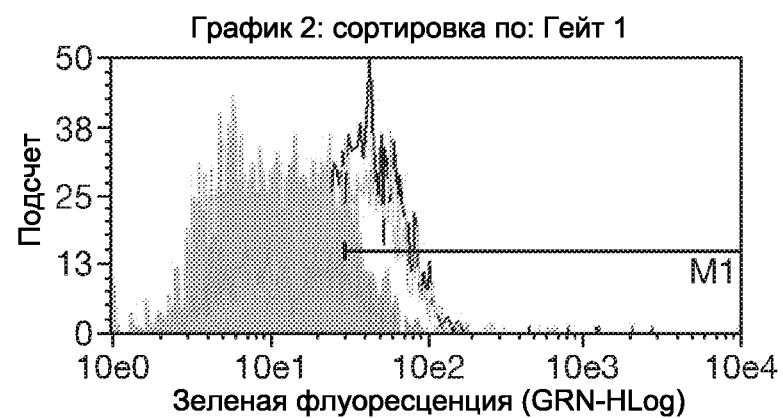


Фиг. 7

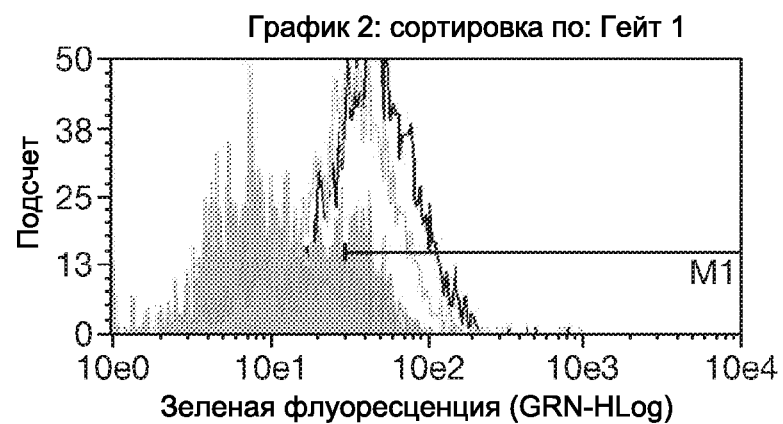
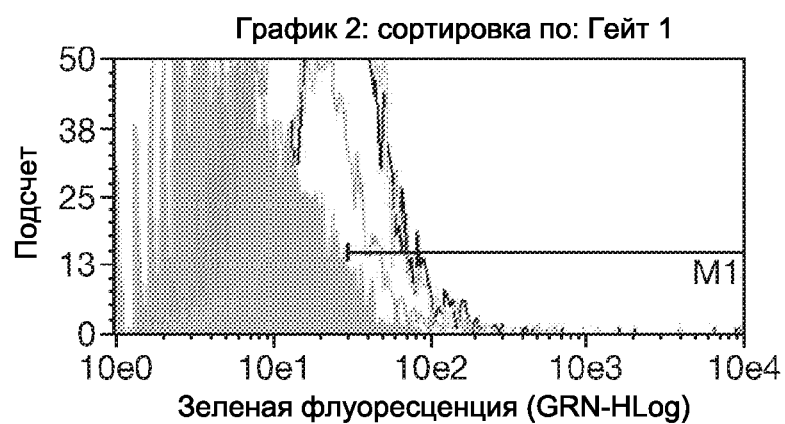
НЧ 1-6



ЖУ



НЧ 6



Фиг. 7 (продолж.)

НерG2

JY

График 2: сортировка по: Гейт 1

График 2: сортировка по: Гейт 1

P1-6

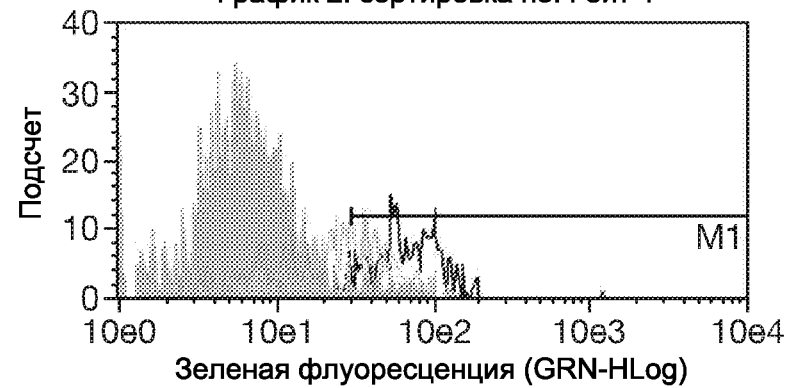
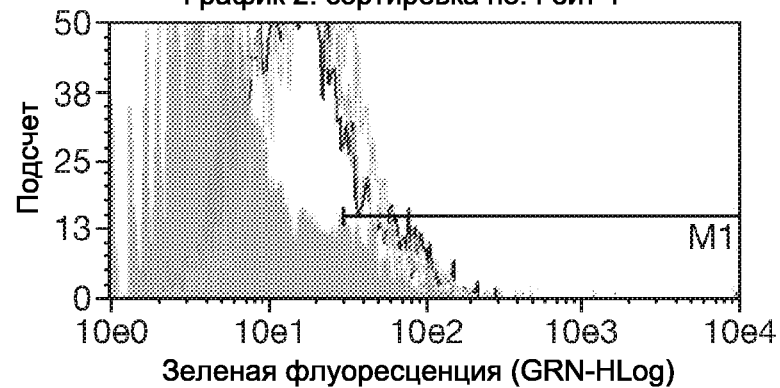
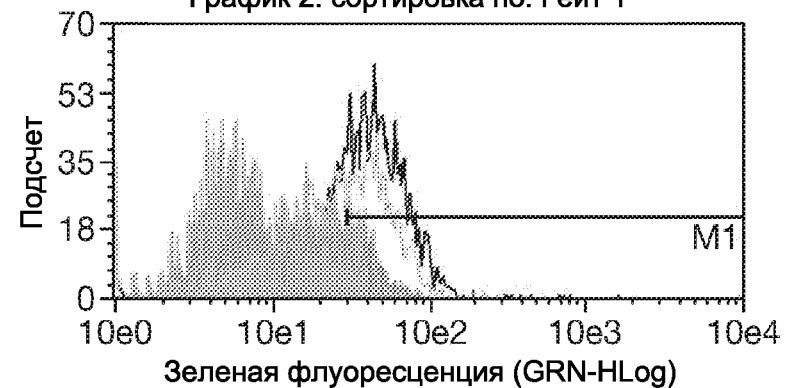
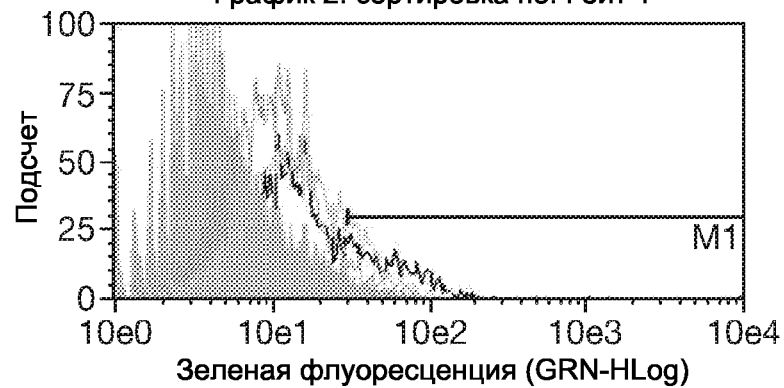


График 2: сортировка по: Гейт 1

График 2: сортировка по: Гейт 1

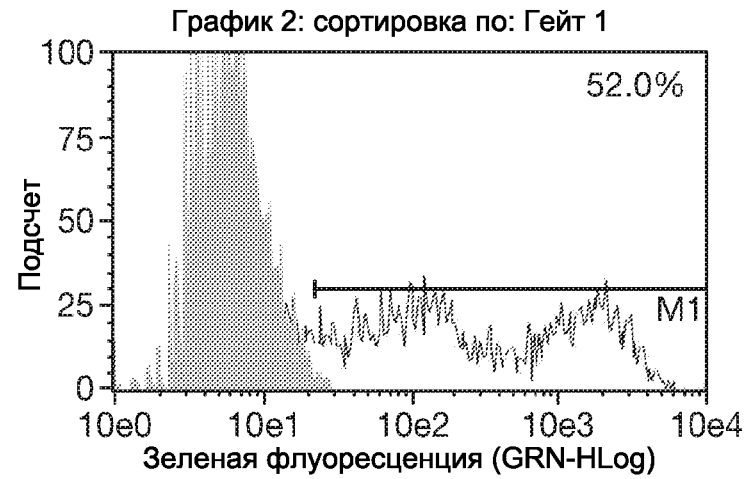
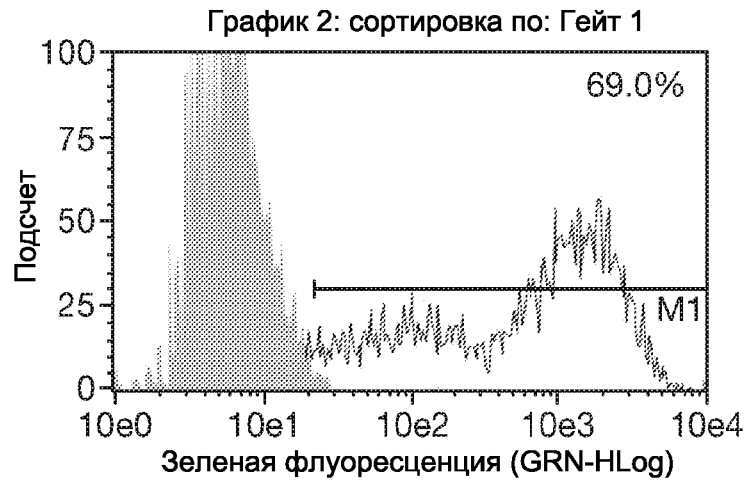
P6



Фиг. 8

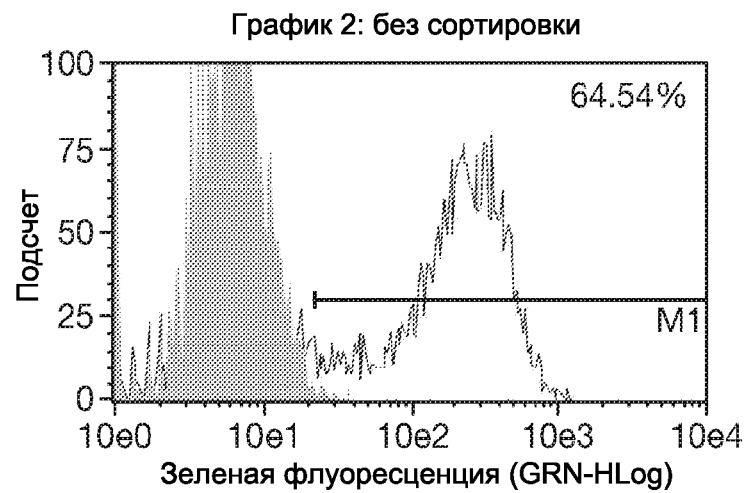
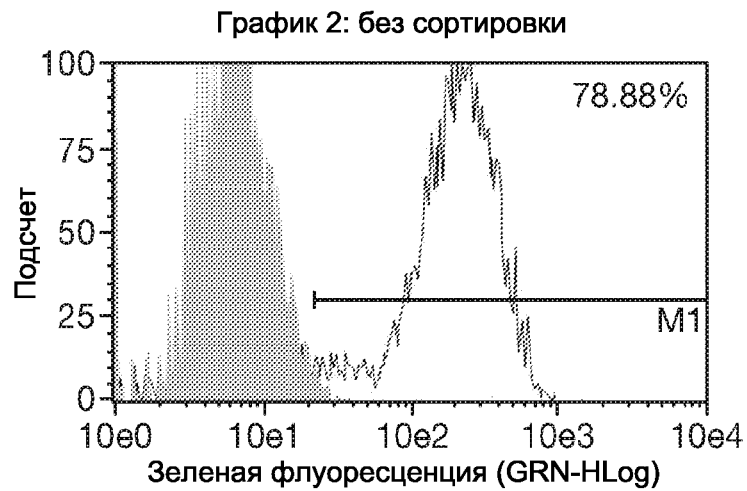
P1-5-имм.

pM2e-имм.

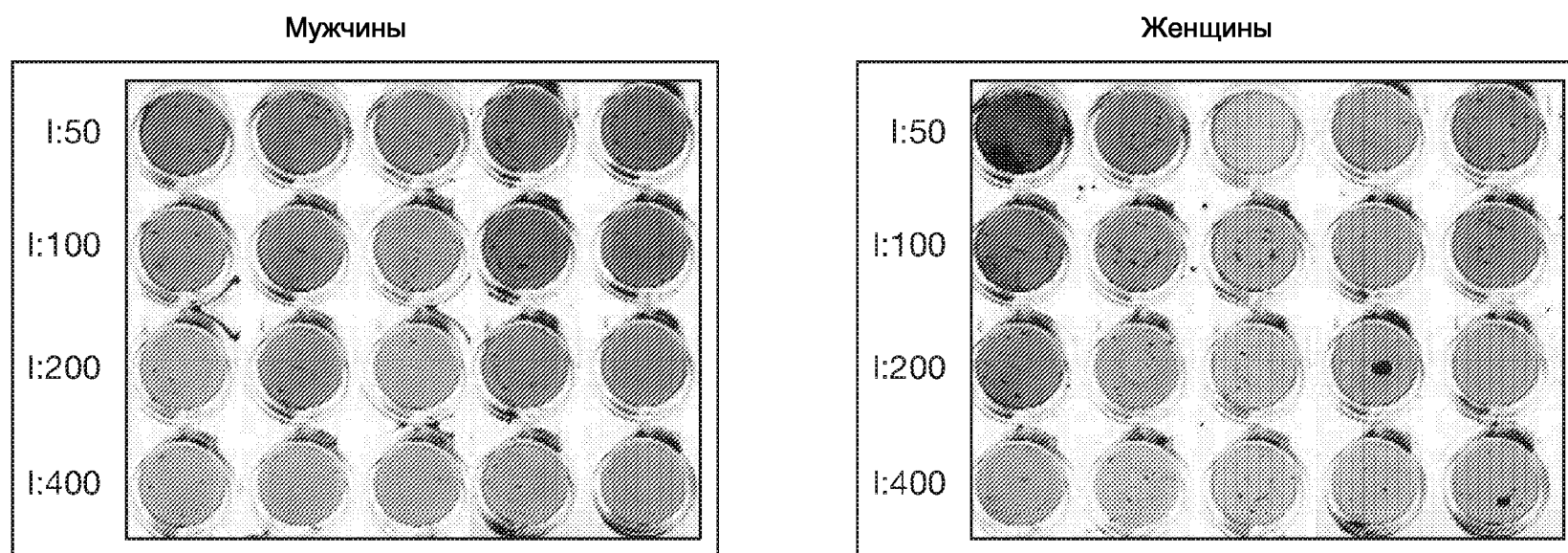


НЧ 1-5-имм.

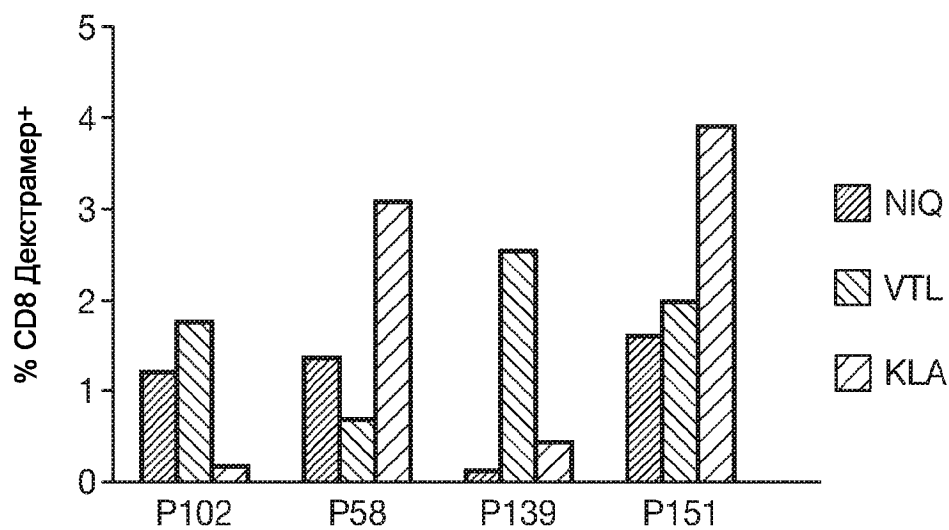
НЧ pM2e-имм.



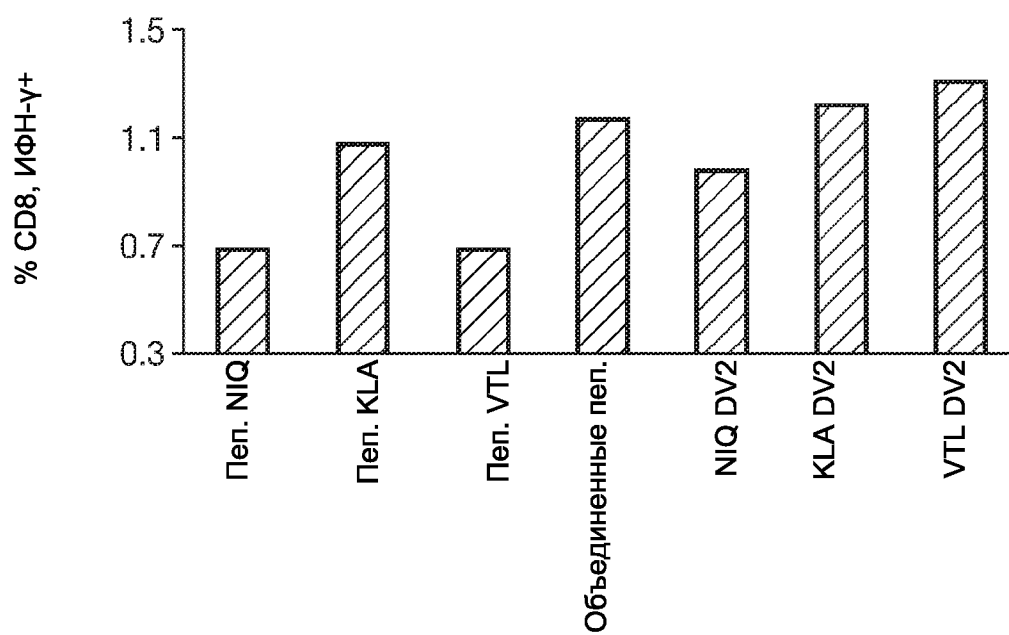
Фиг. 9



Фиг. 10



Фиг. 11



Фиг. 12

