

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202200166 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.04.27

(22) Дата подачи заявки
2021.07.06

(51) Int. Cl. *G01N 33/569* (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
C07K 14/00 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)

(54) ПЕПТИД-ЭПИТОП CD1 ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ ПРИ ЛЕЧЕНИИ ЗАБОЛЕВАНИЯ,
ВЫЗВАННОГО ВНУТРИКЛЕТОЧНЫМ ПАТОГЕНОМ

(31) 20184175.6
(32) 2020.07.06
(33) EP
(86) PCT/EP2021/068585
(87) WO 2022/008479 2022.01.13
(71) Заявитель:
ИКУАЛИ С. А. (BE)

(72) Изобретатель:
Сэн-Рэми Жан Мари (BE)

(74) Представитель:
Нагапетян Э.А. (AM)

(57) Пептид-эпитоп CD1 для применения при лечении заболевания, вызванного внутриклеточным патогеном, способ идентификации этого пептидного эпитопа CD1, фармацевтический набор, содержащий этот пептидный эпитоп CD1, и способ лечения пациента от заболевания, вызванного внутриклеточным патогеном, или для предотвращения такой инфекции, основанной на вакцинации этим пептид-эпитопом CD1.

202200166

A1

A1

202200166

ПЕПТИД-ЭПИТОП CD1 ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ ПРИ ЛЕЧЕНИИ ЗАБОЛЕВАНИЯ, ВЫЗВАННОГО ВНУТРИКЛЕТОЧНЫМ ПАТОГЕНОМ

Область изобретения

Настоящее изобретение относится к области иммунологии для специфического лечения внутриклеточных патогенов при сильной цитотоксической реакции, в которой доминируют цитотоксические Т-клетки.

Уровень техники изобретения

Внутриклеточные патогены, такие как вирусы или бактерии, представляют серьезную проблему, поскольку не существует реального надежного специфического решения.

Действительно, реакция на вирусные инфекции требует активации сильного компонента цитотоксичности, в котором доминируют Т-клетки линии CD8 и естественные клетки - убийцы (КУ). Это достигается естественным способом путем распознавания связанных с мембраной и распределенных в цитозоле молекулярных паттернов, ассоциированных с патогеном (PAMPS) рядом рецепторов распознавания паттернов (PPRs) хозяина, включая toll-подобные рецепторы (TLRs), RIG-подобные рецепторы (RIGs) и Nod-подобные рецепторы (NLRs). За этим следует активация различных сигнальных путей с участием NF- κ B и IRFs, заканчивающихся продукцией цитокинов, в частности интерферонов типа I и типа III.

Однако практически каждый отдельный шаг в этих путях активации может быть мишенью вирусного вмешательства или протеолиза, что в результате приводит к ослаблению врожденного и цитотоксического иммунного ответа. Если патоген проникает в иммунную систему сразу после заражения, он становится устойчивым, либо невидимым для иммунной системы, либо способным модулировать клетку-хозяина, чтобы проникнуть в иммунную систему.

Химиотерапия, включая сильнодействующие антибиотики и противовирусные молекулы, представляет собой решение, но оно связано со значительными побочными эффектами и часто неспособно убить все патогены, скрытые в клетках-хозяинах или в

тканевых нишах, действующих как резервуары, а это означает, что, когда лечение необходимо прекратить, например, чтобы избежать серьезных проблем для пациента из-за этих побочных эффектов, патоген может снова расти и инфицировать другие клетки или ткани пациента.

Даже профилактическая или лечебная (терапевтическая) вакцинация недостаточно эффективна, чтобы вызвать правильный иммунный ответ на все внутриклеточные патогены: иногда удавалось разработать вакцину, иногда все предыдущие попытки терпели неудачу.

Стратегии вакцинации классически используют белки, полученные из вирусов или патогенов, или их кодирующие последовательности в формате ДНК или РНК, вводимые вместе с адъювантом. Такая вакцинация предпочтительно повышает выработку специфических антител в контексте накопления CD4⁺ Т-клеток, но почти не вызывает цитотоксичности.

В дополнение к этому неотъемлемому ограничению сила ответа на вакцину зависит от способности детерминант МНС II типа представлять эпитопы вируса или патогена CD4⁺ Т-клеткам. Большой полиморфизм детерминант МНС II типа в популяции делает эффективность активации CD4⁺ Т-клеток очень изменчивой у разных людей, добавляя еще одну неопределенность в прогнозировании эффективности вакцины и индукции памяти. Действительно, обычно наблюдается ответ антител на исчезающие со временем вирусы.

Поэтому существует крайняя необходимость в разработке стратегий вакцинации, которые позволили бы, насколько это возможно, избежать предпочтительного накопления CD4⁺ Т-клеток в ущерб цитотоксическим клеткам, а также справиться с присущими вариациями ответов из-за полиморфизма МНС II типа.

С другой стороны, способность молекул CD1 нагружать пептидные эпитопы, особенно те, которые несут гидрофобные мотивы в определенных местах, была идентифицирована автором изобретения настоящей заявки на патент и развита в терапевтических применениях, например, в заявках на патент WO 2012/069572, WO 2012/069575, WO 2013/174805 и WO 2018/189405.

Однако прямой подход на основе CD1 до сих пор не получил широкого признания в качестве инструмента в иммунологии. Фактически основная цель этих патентных документов заключается в том, чтобы модифицировать такие пептид-эпитопы для специфической модуляции иммунного ответа, а не для их непосредственного использования в нативной форме в целях вакцинации и/или для тренировки иммунной системы.

Краткое изложение изобретения

Настоящее изобретение относится к пептид-эпиту CD1 для применения в профилактике или лечении заболевания, вызванного внутриклеточным патогеном, причем:

(i) указанное заболевание предпочтительно представляет собой вирусное заболевание, вызванное вирусом, предпочтительно выбранным из группы, состоящей из *Flaviviridae*, *Coronaviridae*, *Orthomyxoviridae*, *Herpesviridae* и *Picornaviridae*,

(ii) указанный пептид-эпитоп CD1 представляет собой фрагмент белка, экспрессируемого указанным внутриклеточным патогеном, причем указанный пептид-эпитоп CD1 содержит последовательность $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7$, причем указанные X_2 , X_3 , X_4 , X_5 , и X_6 независимо представляют любую аминокислоту, причем указанные остатки X_1 и X_7 независимо представляют собой {F;W;T;H или Y}, и

(iii) указанное применение включает введение указанного внутриклеточного патогена в инактивированной форме или введение второго пептида на основе белка указанного внутриклеточного патогена, при этом введение указанного неактивированного внутриклеточного патогена или указанного второго пептида осуществляют после введения пептид-эпитопа CD1, и при этом указанный второй пептид содержит последовательность эпитопа CD1, определенную в (ii), и по меньшей мере один эпитоп МНС I типа.

Кроме того, настоящее изобретение относится к (*in vitro*) способу идентификации одного или нескольких пептид-эпитопов для активации NKT-клеток в Th1-подобном ($IFN\gamma$ и/или IL-12) и/или цитотоксическом ответе на внутриклеточный патоген, включающий этапы идентификации пептид-эпитопа CD1 в указанном

внутриклеточном патогене, и измерения (*in vitro*) способности идентифицированного пептид-эпитопа CD1 активировать NKT-клетки в Th1-подобном и/или цитотоксическом ответе.

Предпочтительно в этом (*in vitro*) способе активацию NKT-клеток измеряют при инкубации пептид-эпитопа с клетками, экспрессирующими молекулу CD1 на своей поверхности, с последующим добавлением популяции NKT-клеток и определением активации указанных NKT-клеток.

Предпочтительно в этом (*in vitro*) способе идентификацию пептид-эпитопа CD1 измеряют по способности пептида (или фрагмента пептида) внутриклеточного патогена связываться с этой молекулой CD1.

Предпочтительно в этом (*in vitro*) способе идентифицированный пептид-эпитоп CD1 имеет последовательность $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7$, при этом эти $X_2X_3X_4X_5X_6$ независимо представляют любую аминокислоту, причем эти указанные остатки X_1 и X_7 независимо представляют собой {F;W;T;H или Y}, причем предпочтительно X_4 представляет собой {I;V;L или M} и/или причем, предпочтительно, по меньшей мере один остаток X_1 или X_7 представляет собой {F;W или Y} и/или, причем, предпочтительно эта последовательность $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7$ принадлежит и/или образует альфа-спираль, возможно, после связывания с CD1.

Преимущественно, в этом (*in vitro*) способе идентифицированный пептид-эпитоп CD1 не содержит эпитоп МНС II типа.

Предпочтительно в этом (*in vitro*) способе активацию NKT-клеток определяют путем количественного определения уровней интерферона (IFN) γ и/или интерлейкина (IL)-12, возможно количественно определяется (определяются) также IL-4, IFN α и/или IFN β и измеряется соотношение IFN γ /IL-4 (или IL-12/IL-4); причем увеличение означает цитотоксический ответ.

Связанным аспектом настоящего изобретения является пептид-эпитоп CD1 для применения в профилактике или лечении заболевания, предпочтительно заболевания, вызванного внутриклеточным патогеном, причем это заболевание предпочтительно представляет собой вирусное заболевание, более предпочтительно выбранное из группы состоящий из *Flaviviridae*, *Coronaviridae*, *Orthomyxoviridae*, *Herpesviridae* и

Picornaviridae, и причем пептид-эпитоп CD1 представляет собой фрагмент белка, экспрессируемого этим внутриклеточным патогеном, причем этот фрагмент предпочтительно не содержит эпитоп МНС II типа .

Преимущественно этот пептид-эпитоп CD1 (для применения в профилактике или лечении заболевания, вызванного внутриклеточным патогеном) может быть получен описанным выше (*in vitro*) способом.

Другим связанным аспектом настоящего изобретения является набор частей (для применения при лечении заболевания, предпочтительно заболевания, вызванного внутриклеточным патогеном), включающий первый пептид, представляющий собой описанный выше пептид-эпитоп CD1 (преимущественно не включающий эпитоп МНС II типа) и второй пептид, полученный из этого внутриклеточного патогена и представляющий собой пептид, содержащий этот первый пептид-эпитоп в дополнение к другим эпитопам, предпочтительно по меньшей мере один эпитоп МНС II типа.

Этот набор частей предпочтительно предназначен для лечения вирусного заболевания, более предпочтительно выбранного из группы, состоящей из *Flaviviridae*, *Coronaviridae*, *Orthomyxoviridae*, *Herpesviridae* и *Picornaviridae*.

Предпочтительно этот набор частей дополнительно содержит адъювант для вакцинации первым пептидом (пептид-эпитопом CD1, преимущественно не содержащий эпитоп МНС II типа) и/или адъювант для вакцинации вторым пептидом (преимущественно содержащий пептид-эпитоп CD1) и эпитоп МНС II типа, возможно также другие эпитопы МНС I или II типа).

Предпочтительно этот набор частей дополнительно содержит средства для количественного определения IgG1 и/или IgG3, специфичного для пептид-эпитопа CD1 (или общего IgG1 и/или IgG3), и/или средства для количественного определения всех IgG (или, по меньшей мере, IgG2), или IgGs, кроме IgG1 и/или IgG3, специфичных для пептид-эпитопа CD1 (или общего IgG или IgG, кроме IgG1 и/или IgG3, такого как IgG2).

Предпочтительно этот набор частей дополнительно включает средства для количественного определения IgG1 и/или IgG3, специфичные для второго пептида (или общего IgG1 и/или IgG3), и/или средства для количественного определения всех

IgGs (или IgG2), специфичных для второго пептида, или все IgGs (IgG2), кроме этих IgG1 и/или IgG3, специфичных для второго пептида (или общего IgG, или IgGs, кроме IgG1 и/или IgG3, таких как IgG2), эти IgGs (IgG2), кроме IgG1 и IgG3, возможно, неспецифичных в отношении (первого) пептид-эпитопа CD1.

Преимущественно измеряется соотношение {IgG1 и/или IgG3}:IgGs (или IgG2), и/или (относительное) увеличение (специфичного) IgG1 и/или IgG3 указывает на цитотоксический ответ иммунной системы, который отражает правильную реакцию на лечение.

Предпочтительно этот набор частей дополнительно содержит средства для количественного определения уровней IFN γ , и/или IL-12, и/или IL-4, и/или IFN α , и/или IFN β .

Другим связанным аспектом настоящего изобретения является фармацевтический способ приведения иммунной системы пациента к специфической Th1-подобной и/или цитотоксической реакции против внутриклеточного патогена, включающий стадии идентификации пептид-эпитопа CD1 в белке, экспрессируемом указанным внутриклеточным патогеном, и (*in vitro*) измерения способности идентифицированного пептид-эпитопа CD1 активировать NKT-клетки в Th1-подобном (IFN γ и/или IL-12) ответе и/или вызывать цитотоксический ответ, а также введение первого пептида, являющегося (по существу) этим пептид-эпитопом CD1, пациенту, предпочтительно вместе с вакцинным адъювантом.

Предпочтительно в этом способе стадия идентификации пептид-эпитопа CD1 во внутриклеточном патогене включает определение способности пептида связываться с указанной молекулой CD1.

Предпочтительно этот способ дополнительно включает инкубацию пептид-эпитопа с клетками, несущими CD1, с последующим добавлением популяции NKT-клеток и определением активации этих NKT-клеток.

Предпочтительно в этом методе (цитотоксическую) активацию NKT-клеток определяют путем количественного определения уровней IFN γ и/или IL-12 (также преимущественно уровней IFN α и/или IFN β и, возможно, IL-4).

Предпочтительно в этом способе эпитоп имеет консенсусную последовательность $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7$, из которой эти $X_2X_3X_4X_5X_6$ независимо представляют собой любую аминокислоту, из которой эти остатки X_1 и X_7 независимо представляют собой {F;W;T;H или Y}, причем предпочтительно X_4 представляет собой {I;V;L или M} и/или причем, предпочтительно, по крайней мере один остаток X_1 или X_7 представляет собой {F;W или Y}, и/или причем, предпочтительно, указанная последовательность $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7$ принадлежит и/или образует альфа-спираль, возможно, после связывания с CD1.

Предпочтительно этот способ дополнительно включает стадию (*ex vivo*) измерения специфического цитотоксического ответа на указанный эпитоп в образце, взятом у пациента после введения пептид-эпитопа.

Преимущественно в этом фармацевтическом способе пептид, содержащий эпитоп CD1, не содержит эпитоп МНС II типа.

Предпочтительно этот фармацевтический способ дополнительно включает последующую стадию введения пациенту вакцины, представляющей собой второй пептид, содержащий эпитоп МНС II типа, предпочтительно вместе с адъювантом, и предпочтительно представляющий собой пептид, дополнительно содержащий пептид-эпитоп CD1, и, возможно, содержащий эпитоп МНС I или II типа.

Предпочтительно, этот способ включает стадию измерения уровня IgG1 и/или IgG3 (из образца крови пациента), преимущественно способного распознавать указанный пептид-эпитоп CD1, возможно, после инъекции пептид-эпитопа CD1 (не содержащего эпитоп МНС II типа) и/или после инъекции второго пептида (содержащего пептид-эпитоп CD1 и эпитоп МНС II типа).

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Автор изобретения обнаружил, что вакцинация пациентов против внутриклеточных патогенов, включая вирусы, классически проводимая в данной области техники, иногда неэффективна.

С другой стороны, автор изобретения обнаружил, что, когда процедуре вакцинации предшествует введение CD1-рестриктированного эпитопа (или

кодирующих нуклеотидных последовательностей) того же вируса или внутриклеточного патогена, иммунный ответ против вируса или внутриклеточного патогена вызывает повышенную цитотоксичность, включая CD8⁺ Т-клетки, NKT и NK-клетки, вместе со значительно повышенными концентрациями специфических антител и активацией CD4⁺ Т-клеток по сравнению с вакцинацией (классическим) введением пептида вируса или патогена вместе с адъювантом. Другими словами, хотя хроническая инфекция в основном возникает в результате стратегий, разработанных патогенами для подрыва адаптивного иммунитета, автор изобретения обнаружил, что форсирование врожденного ответа обеспечивает усиление эффективного адаптивного ответа.

Являясь пионером в обнаружении возможности модулирования иммунной системы на основе взаимодействия пептида CD1 (в настоящем изобретении, если не указано иное, термин «CD1» означает в совокупности CD1a, CD1b, CD1c и CD1d, но не CD1e), автор изобретения обнаружил, что вакцинация пациента эпитопами CD1 вызывает или способствует последующему локальному и/или специфическому Th1-подобному ответу с цитотоксическими функциями и/или локальной и/или специфической продукцией IFN γ и/или цитокинов IL-12. Другим отличительным признаком активации NKT для запуска цитотоксического ответа является уровень экспрессии ими перфорина и гранзимов.

Таким образом, этот ответ представляет собой значительную дополнительную ценность по сравнению с классической вакцинацией, поскольку пептиды, выбранные на другой, более сфокусированной основе, вызывают более предсказуемый ответ иммунной системы, в данном случае скорее сфокусированный Th1-подобный ответ, чем менее предсказуемый ответ.

Действительно, настоящее изобретение позволяет вызвать у пациента сильный иммунный ответ с преобладанием цитотоксических Т-клеток, избегая при этом вредного воздействия (i) экзогенных молекул, модулирующих иммунитет неселективным образом, а также (ii) неправильной реакции организма больного на внутриклеточный патоген.

Кроме того, автор изобретения обнаружил, что такая вакцинация, ориентированная на CD1, синергизирует с последующей более классической схемой

вакцинации, не обязательно ориентированной на CD1/NKT и цитотоксический ответ, потому что иммунная система сначала была подготовлена к правильному ответу: ответ на последующую вакцинацию теперь правильно ориентирован и усилен.

Следовательно, первым аспектом настоящего изобретения является пептид-эпитоп CD1 для применения в профилактике или лечении заболевания, вызванного внутриклеточным патогеном, причем

(i) указанное заболевание предпочтительно представляет собой вирусное заболевание, вызываемое вирусом, предпочтительно выбранным из группы, состоящей из *Flaviviridae*, *Coronaviridae*, *Orthomyxoviridae*, *Herpesviridae* и *Picornaviridae*,

(ii) указанный пептид-эпитоп CD1 представляет собой фрагмент белка, экспрессируемого указанным внутриклеточным патогеном, при этом указанный пептид-эпитоп CD1 содержит последовательность $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7$, причем указанные X_2 , X_3 , X_4 , X_5 , и X_6 независимо представляют собой любую аминокислоту, и причем указанные остатки X_1 и X_7 независимо представляют собой {F;W;T;H или Y}, и

(iii) указанное применение включает введение указанного внутриклеточного патогена в неактивированной форме или введение второго пептида на основе белка указанного внутриклеточного патогена, при этом введение указанного неактивированного внутриклеточного патогена или указанного второго пептида осуществляют после введения пептид-эпитопа CD1, и при этом указанный второй пептид содержит последовательность эпитопа CD1, определенную в (ii), и по меньшей мере один эпитоп MHC I типа.

В одном варианте осуществления X_4 представляет собой {I;V;L или M}. В другом варианте осуществления по меньшей мере один остаток X_1 или X_7 представляет собой {F;W или Y}. В еще одном варианте осуществления указанная последовательность $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7$ принадлежит и/или образует или способна образовывать альфа-спираль.

В одном варианте осуществления пептид-эпитоп CD1, т.е. пептид, используемый для первого введения, не содержит эпитоп MHC I типа.

В одном варианте осуществления пептид-эпитоп CD1, т.е. пептид, используемый для первого введения, не содержит эпитоп MHC II типа.

В одном варианте осуществления указанный второй пептид, т.е. пептид, используемый для второго введения, дополнительно содержит по меньшей мере один эпитоп МНС II типа.

Еще одним аспектом настоящего изобретения является фармацевтический способ приведения иммунной системы пациента к специфической Th1-подобной и/или цитотоксической реакции против внутриклеточного патогена, включающий этапы идентификации (*in silico*) (предполагаемого) пептид-эпитопа CD1 (CD1a, CD1b, CD1c и/или CD1d) в указанном внутриклеточном патогене, измерения *in vitro* способности идентифицированного (предполагаемого) пептид-эпитопа CD1 (CD1a, CD1b, CD1c и/или CD1d) активировать NKT-клетки в цитотоксическом ответе (продукция IFN γ и/или IL-12; экспрессия перфорина и гранзимов; также измерение включения 3H-тимидина и/или экспрессии NUR77) и введения (т.е. первый этап вакцинации, первая вакцина; см. ниже для второй вакцины) указанного (подтвержденного) пептид-эпитопа CD1 (CD1a, CD1b, CD1c и/или CD1d) пациенту, предпочтительно вместе с адъювантом.

Возможно, вместо (непосредственного) введения пептид-эпитопа CD1 пациенту вводят нуклеотидную последовательность, кодирующую такой пептид-эпитоп CD1.

Предпочтительными патогенами являются вирусы, такие как ДНК-вирусы, РНК-вирусы, такие как *флавивirus* (вирус Западного Нила, вирус Денге) или *коронавирусы*, а также бактерии и микобактерии, такие как *микобактерии туберкулеза* и другие микобактерии, патогенные для человека или животных, *Иерсинии*, *Бруцеллы*, *Хламидии*, *Микоплазмы*, *Риккетсии*, а также простейшие паразиты, например *Leishmania* sp., *Trypanosoma* sp., *Toxoplasma* sp., *Listeria* sp. и *Histoplasma* sp.

Идентификация *in silico* предпочтительно достигается путем сначала идентификации внутриклеточного патогена, затем, необязательно, скрининга подходящих белков, затем скрининга мотивов, чувствительных к связыванию молекулами CD1 (CD1a, CD1b, CD1c и/или CD1d). Способность пептида (содержащего (предполагаемый) эпитоп) связываться с молекулой CD1 (CD1a, CD1b, CD1c и/или CD1d) предпочтительно дополнительно определяют *in vitro* способом.

Предпочтительно в этом способе активацию NKT-клеток измеряют при инкубации идентифицированного (предполагаемого) пептид-эпитопа (*in silico* и/или после описанной выше стадии связывания *in vitro*) с клетками, несущими CD1 (CD1a, CD1b, CD1c и/или CD1d), с последующим добавлением популяции NKT-клеток и определением активации этих NKT-клеток, например, по их способности оказывать цитотоксическое действие на репортерные клетки.

Предпочтительно, активация NKT-клеток (также) определяется количественным определением уровней IFN γ и/или IL-12 (количественное определение уровня мРНК или белка; см. ниже) или экспрессии перфорины и/или гранзимов и/или уровня(ей) NUR77, а также включение ЗН тимидина (NKT-клетками). Это позволяет гарантировать, что выбранный пептид-эпитоп вызовет правильный цитотоксический иммунный ответ при введении пациенту.

В этом способе (на стадии *in silico*) предпочтительно пептид-эпитоп представляет собой (CD1, такой как CD1d) пептид-эпитоп, имеющий консенсусную последовательность $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7$, причем такие $X_2X_3X_4X_5X_6$ независимо представляют собой любую аминокислоту, причем остатки X_1 и X_7 независимо представляют собой {F;W;T;H или Y}, причем предпочтительно X_4 представляет собой {I;V;L или M} и/или причем предпочтительно по меньшей мере один остаток X_1 или X_7 представляет собой {F;W или Y} и/или причем предпочтительно последовательность $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7$ образует и/или является частью альфа-спирали, возможно, после связывания с CD1.

Наличие хотя бы одного остатка F, W или Y на X_1 или X_7 обеспечивает прочное заякоривание на CD1.

Конфигурация в виде спирали также полезна для хорошего сродства к CD1. Это означает, что другие аминокислоты совместимы с альфа-спиралью, особенно аминокислота в положении X_4 .

Наличие альфа-спирали можно предсказать *in silico* с помощью легкодоступных алгоритмов. В настоящем изобретении некоторые аминокислоты, такие как пролин или глицин, которые, как известно, разрывают альфа-спирали, тем не менее приемлемы в определенных положениях. Например, возможен глицин в остатках X_2, X_3, X_5 , или X_6 , поскольку такой остаток обеспечивает большую гибкость, что полезно для фиксации

CD1. И наоборот, остаток пролина (например, в предполагаемом положении X_0 или X_{-1-2-3}) может быть первой аминокислотой альфа-спирали. С другой стороны, громоздкие аминокислоты, такие как аргинин или триптофан, не являются предпочтительными в промежуточных положениях X_2-X_6 , тогда как триптофан может присутствовать и даже является одной из предпочтительных аминокислот в X_1 и/или X_7 .

Помимо скрининга *in silico*, возможность образования альфа-спирали можно проверить с помощью химического анализа, такого как ЯМР или рентгеновский анализ, предпочтительно после загрузки CD1.

Таким образом, предпочтительная последовательность CD1 имеет остаток W, F или Y на X_1 и/или X_7 и образует (или способна образовывать) альфа-спираль.

Также предпочтительная последовательность CD1 имеет остаток W, F или Y на X_1 и/или X_7 и остаток I, L, M или V на X_4 .

Наиболее предпочтительные последовательности CD1 имеют остаток W, F или Y на X_1 и/или X_7 и остаток I, L, M или V на X_4 и образуют (или способны образовывать) альфа-спираль.

В этом способе, в качестве альтернативы или в дополнение, пептид-эпитоп (образующий или обладающий способностью образовывать альфа-спираль) выбирается на первой стадии *in silico* скрининга, основанной на идентификации кластеризации гидрофобных аминокислот в пептиде (например, по меньшей мере 2 гидрофобные аминокислоты на участке до 12 аминокислот, до 10, до 7 аминокислот, предпочтительно не менее 3 гидрофобных аминокислот на участке до 12 аминокислот, до 10, до 7 аминокислот, или по меньшей мере 4 аминокислоты на участке до 12 аминокислот, до 10, до 7 аминокислот).

Формулировка «гидрофобные аминокислоты» хорошо понятна специалисту в данной области. В контексте настоящего изобретения это предпочтительно относится к метионину (M), лейцину (L), изолейцину (I), фенилаланину (F), тирозину (Y) и триптофану (W).

В этом *in silico* скрининге (включая *in silico* скрининг X_1-X_7 и альтернативный *in silico* скрининг) эпитоп CD1 предпочтительно не содержит эпитоп МНС II типа. Такой эпитоп, хотя и желателен при классической вакцинации, в том числе на последующем

этапе вакцинации согласно настоящему изобретению (см. ниже), может снижать, потенциально сильно снижать управляемый CD1 ответ иммунной системы.

Одним из удобных способов обеспечить это является выбор достаточно коротких пептидов и/или выбор пептидов, в которых отсутствуют предсказанные эпитопы МНС II типа (например, укороченные пептиды, из которых были удалены предполагаемые эпитопы МНС II типа). Подходящие пептиды могут быть выбраны методами, известными в данной области. Например, Poluektov et al. Vaccine 39: 2110-2216, 2021 описывает выбор эпитопа для SARS-CoV2.

Действительно, одним удобным способом избежать эпитопа МНС II типа является разработка коротких пептидов, содержащих эти эпитопы CD1, например, менее 50, менее 40, менее 30, менее 20 аминокислот. Минимальный пептид, содержащий эпитоп CD1, может иметь размер 11 аминокислот, включая показанный выше консенсус из 7 аминокислот. Таким образом, в одном варианте осуществления пептид-эпитоп CD1 для применения, согласно изобретению, представляет собой фрагмент (т.е. непрерывный фрагмент) белка, экспрессируемого внутриклеточным патогеном, от 11 до 50 аминокислот в длину, например, от 11 до 40, или от 11 до 30, или от 11 до 20 аминокислот в длину.

В другом варианте осуществления пептид-эпитоп CD1 для применения согласно изобретению дополнительно содержит фланкирующие последовательности, которые не соответствуют фланкирующим областям в белке, экспрессируемом внутриклеточным патогеном. Таким образом, в таких вариантах осуществления пептид-эпитоп CD1 содержит фрагмент белка, экспрессируемого внутриклеточным патогеном, от 11 до 50 аминокислот в длину, например, от 11 до 40, или от 11 до 30, или от 11 до 20 аминокислот в длину.

Действительно, предпочтительно, чтобы эпитоп CD1 все еще образовывал или имел способность образовывать альфа-спираль, что предполагает некоторые биофизические ограничения, в том числе в отношении минимального размера эпитопа и, таким образом, также наличия фланкирующих остатков: такие остатки не участвуют непосредственно в фиксации CD1, однако они придают конформацию всей последовательности, которая влияет на ее способность связываться с CD1.

Другой способ исключить эпитоп МНС II типа, например, если предполагается разработать более длинные пептиды, это полагаться на *in silico* анализ.

Другой практический способ заключается в том, чтобы полагаться на клеточный тест, в котором клетки трансфицируют гаплотипами МНС II типа человека (несколько клеточных линий, каждая из которых трансфицирована разными гаплотипами МНС II типа), а затем тестируют, чтобы проверить, квалифицируется ли пептид, содержащий эпитоп CD1, также как эпитоп МНС II типа, и отвергать такие пептиды. Например, можно протестировать от 15 до 20 преобладающих гаплотипов МНС.

Этот способ предпочтительно дополнительно включает стадию *ex vivo* измерения специфического цитотоксического ответа на эпитоп CD1. Это позволяет обеспечить, помимо непосредственного цитотоксического действия NKT-клеток, правильную активацию иммунной системы перед введением пациенту второго пептид-эпитопа (см. ниже второй этап вакцинации).

Этот способ предпочтительно дополнительно включает последующую вторую стадию вакцинации, заключающуюся во введении пациенту вакцины, предпочтительно на основе того же белка, содержащего эпитоп CD1, экспрессируемый внутриклеточным патогеном, предпочтительно вместе с адъювантом. Эта вакцина содержит второй пептид, который содержит по меньшей мере один второй эпитоп, отличный от пептид-эпитопа CD1. Предпочтительно эта вторая вакцина содержит по меньшей мере один эпитоп МНС I типа и по меньшей мере один эпитоп МНС II типа. Предпочтительная вторая вакцина предпочтительно содержит как эпитоп CD1 первой вакцины, так и этот эпитоп МНС II типа. Подходящие эпитопы МНС II типа могут быть идентифицированы с использованием способов, описанных выше, т.е. *in silico* способов предсказания и/или тестирования на клеточных линиях, экспрессирующих гаплотипы МНС II типа человека. Подходящие эпитопы МНС I типа могут быть идентифицированы способами, известными в данной области, например, описанными в Yang et al. BMC Bioinformatics 22:231, 2021.

Эту вторую стадию вакцинации можно проводить после того, как удостоверились, что NKT-клетки были правильно активированы первой (CD1-рестриктивной) вакциной, чтобы вызвать цитотоксический ответ.

Эпитоп(ы) или пептид(ы), используемые для этой второй стадии вакцинации, не обязательно ориентированы на эпитопы CD1: можно использовать пептиды, несущие множественные эпитопы, а также пептиды, несущие эпитопы МНС II типа, и фактически они предпочтительно использованы. Пептиды, используемые в этой последующей вакцинации, могут также содержать (предполагаемые) эпитопы CD1 и даже подтвержденные эпитопы CD1, предпочтительно эпитоп CD1, использованный в первой вакцинации.

В некоторых вариантах осуществления вторая стадия включает введение полноразмерного белка внутриклеточного патогена, предпочтительно белка, который также содержит пептид-эпитоп CD1, или неактивированной формы патогена, такой как живой аттенуированный вирус.

В одном варианте осуществления патоген представляет собой вирус Денге, а пептид-эпитоп CD1 представляет собой фрагмент белка NS, предпочтительно NS5, и содержит или состоит из последовательности, представленной в SEQ ID NO:1. Предпочтительно длина пептид-эпитопа CD1 составляет от 11 до 50 аминокислот в длину, например, от 11 до 40, или от 11 до 30, или от 11 до 20 аминокислот в длину. В еще одном варианте осуществления настоящего изобретения второй пептид представляет собой полноразмерный белок NS5.

В другом варианте осуществления патоген представляет собой вирус Коксаки B4, а пептид-эпитоп CD1 представляет собой фрагмент полипротеина, предпочтительно содержащий или состоящий из последовательности, представленной в SEQ ID NO:2. Предпочтительно длина пептид-эпитопа CD1 составляет от 11 до 50 аминокислот в длину, например, от 11 до 40, или от 11 до 30, или от 11 до 20 аминокислот в длину. В еще одном варианте осуществления настоящего изобретения второй пептид представляет собой полноразмерный полипротеин.

В другом варианте осуществления патоген представляет собой вирус SARS-CoV2, а пептид-эпитоп CD1 представляет собой фрагмент белка S, предпочтительно содержащий или состоящий из последовательности, представленной в SEQ ID NO:3. Предпочтительно длина пептид-эпитопа CD1 составляет от 11 до 50 аминокислот в длину, например, от 11 до 40, или от 11 до 30, или от 11 до 20 аминокислот в длину. В

еще одном варианте осуществления настоящего изобретения второй пептид представляет собой полноразмерный S-белок.

В другом варианте осуществления патоген представляет собой вирус гриппа А, а пептид-эпитоп CD1 представляет собой фрагмент белка гемагглютинина, предпочтительно содержащий или состоящий из последовательности, представленной в SEQ ID NO:4. Предпочтительно длина пептид-эпитопа CD1 составляет от 11 до 50 аминокислот в длину, например, от 11 до 40, или от 11 до 30, или от 11 до 20 аминокислот в длину. В другом варианте осуществления настоящего изобретения второй пептид представляет собой полноразмерный гемагглютинин.

В другом варианте осуществления патоген представляет собой вирус простого герпеса, а пептид-эпитоп CD1 представляет собой фрагмент белка Vp16, предпочтительно содержащий или состоящий из последовательности, представленной в SEQ ID NO:5. Предпочтительно длина пептид-эпитопа CD1 составляет от 11 до 50 аминокислот в длину, например, от 11 до 40, или от 11 до 30, или от 11 до 20 аминокислот в длину. В еще одном варианте осуществления настоящего изобретения вакцинация проводится живой инактивированной вакциной против ВПГ.

Связанным аспектом настоящего изобретения является *in vitro* способ для идентификации пептид-эпитопов для активации NKT-клеток при установлении (последующего) цитотоксического ответа (IFN γ и/или IL-12; перфорин, гранзимы и/или уровень экспрессии NUR77; включение 3Н тимидина) в отношении внутриклеточного патогена, включающего этапы идентификации эпитопа CD1 (CD1a, CD1b, CD1c и/или CD1d) в этом внутриклеточном патогене и *in vitro* измерения способности идентифицированного эпитопа CD1 (CD1a, CD1b, CD1c и/или CD1d) активировать NKT-клетки в цитотоксическом ответе.

Предпочтительно в этом *in vitro* способе эпитоп CD1 (эпитоп(ы) CD1a, CD1b, CD1c и/или CD1d)) идентифицируют по способности пептида связываться с этой (этими) CD1 (CD1a, CD1b, CD1c и/или CD1d) молекулой (молекулами).

Предпочтительно (или в дополнение к связыванию с CD1) этот пептид, потенциально связывающийся с этой (этими) CD1 (CD1a, CD1b, CD1c и/или CD1d молекулой (молекулами)), идентифицируют на предварительной (*in silico*) стадии, как

показано в описанном выше фармацевтическом способе (наличие участка гидрофобных аминокислот или наличие эпитопа $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7$ со специфическими аминокислотами в положениях 1, 7 (F/W/T/H/Y) и, возможно, также в положении 4 (I/L/M/V).

Предпочтительно или дополнительно в этом *in vitro* способе активацию NKT-клеток измеряют при инкубации пептид-эпитопа с клетками, несущими CD1 (CD1a, CD1b, CD1c и/или CD1d), с последующим добавлением популяции NKT-клеток, и путем определения активации этих NKT-клеток.

Предпочтительно, в этом способе (также, возможно, для вышеуказанного фармацевтического способа или для нижеуказанного фармацевтического продукта) активацию NKT-клеток определяют путем количественного определения уровней $IFN\gamma$ и/или IL-12, например, на основе уровня экспрессии мРНК для $IFN\gamma$ и/или IL-12 или по количеству белка в окружающей (кондиционированной) среде для культивирования клеток, например, с помощью измерения ELISA. Уровни экспрессии перфорина и гранзимов также могут быть успешно измерены, а также NUR77 (уровень мРНК) или включение 3H-тимидина (в таких NKT-клетках).

Связанным аспектом настоящего изобретения является пептид-эпитоп CD1 (вакцина) (CD1a, CD1b, CD1c и/или CD1d) для применения при лечении заболевания, вызванного внутриклеточным патогеном, предпочтительно вирусом.

Альтернативно, вместо прямого введения пептид-эпитопа CD1 пациенту можно вводить соответствующую нуклеотидную последовательность, экспрессирующую этот пептид-эпитоп CD1.

Хотя в действительности это вирусное заболевание не ограничивается конкретным вирусным заболеванием или вирусом, это вирусное заболевание предпочтительно выбирают из группы, состоящей из *Flaviviridae* (вирус Западного Нила, вирус Денге), *Coronaviridae* (SARS, такой как SARS-CoV-2), *Orthomyxoviridae* (вирус, вызывающий грипп), *Herpesviridae* (вирус герпеса, включая вирус Эпштейна-Барра (ВЭБ)) и *Picornaviridae*. Вирусные заболевания в контексте настоящего изобретения также включают злокачественные заболевания, связанные с вирусами,

например лимфому, связанную с ВЭБ, в частности ВЭБ -ассоциированные лимфомы, возникающие после трансплантации органов, таких как трансплантация печени.

Внутриклеточные инфекции, вызванные бактериями и микобактериями, такими как *Mycobacterium tuberculosis* и другими микобактериями, патогенными для человека или животных, *иерсиниями, бруцеллами, хламидиями, микоплазмами, риккетсиями*, а также простейшими паразитами, *например Leishmania sp., Trypanosoma sp., Toxoplasma sp., Listeri sp. и Histoplasma sp.*, согласно настоящему изобретению можно лечить путем вакцинации CD1-пептидом.

Предпочтительно этот пептид-эпитоп CD1 (CD1a, CD1b, CD1c и/или CD1d) можно получить, как указанным выше *in vitro* способом, и/или следуя тому же подходу, что и указанным выше *in vitro* способом для идентификации пептидных эпитопов для активации NKT-клеток, со специфичными *in silico* стадиями, *in vitro* стадией (связывание CD1) и/или стадией (*in vitro*) измерения активации NKT-клеток.

Другим связанным аспектом настоящего изобретения является набор частей для применения при лечении заболевания, вызванного внутриклеточным патогеном, содержащий пептидный эпитоп CD1 (CD1a, CD1b, CD1c и/или CD1d) (предпочтительно CD1a, CD1b, CD1c и /или пептидный эпитоп CD1d, описанный выше и не содержащий эпитоп МНС II типа), и второй пептид, предпочтительно содержащий эпитоп МНС II типа, полученный из внутриклеточного патогена, предпочтительно относящийся к тому же белку, несущему этот пептидный эпитоп CD1, более предпочтительно второй пептид содержит по меньшей мере пептидный эпитоп CD1 и (один или несколько) эпитопов МНС II типа.

Этот набор частей преимущественно используют для лечения заболевания, вызванного внутриклеточным патогеном, таким как вирус, а также внутриклеточной бактерией (см. выше).

Предпочтительно этот набор частей дополнительно содержит адъювант для вакцинации пептидным эпитопом CD1 (CD1a, CD1b, CD1c и/или CD1d) и/или адъювант для вакцинации вторым пептидом.

Предпочтительные адъюванты выбирают по их способности вызывать воспалительную реакцию, такую как, липидные эмульсии. Адъювант квасцов не является предпочтительным для пептидного эпитопа CD1.

Альтернативно, вместо пептидного эпитопа CD1 из настоящего набора частей пациенту можно вводить соответствующую нуклеотидную последовательность, экспрессирующую этот пептидный эпитоп CD1.

Примеры

1. Заражение вирусом Денге

Денге является серьезной проблемой общественного здравоохранения в тропических и субтропических регионах. Этот флавивирус, покрытый оцРНК (одноцепочечный РНК), вызывает лихорадочный синдром, который может принимать тяжелую геморрагическую форму, приводящую к шоковому синдрому. Хотя вирус активирует ответ интерферона α/β , последний серьезно нарушен рядом механизмов, препятствующих эффективному ответу. Выявление сильного врожденного ответа на вирус Денге поможет контролировать инфекцию за счет его способности вызывать ответ CD8⁺ Т-клеток, который, как известно, является защитным, в то время как точная роль антител все еще обсуждается.

Неструктурные (NS) белки используются для разработки стратегии вакцинации, учитывая, что иммунный ответ на NS необходим для обеспечения эффективной защиты от вируса. Таким образом, NS5 выбран для следующих экспериментов на основании его важности в блокировании сигналов, необходимых для продукции интерферонов альфа и бета.

Последовательность NS5 показывает детерминанту с характеристиками, необходимыми для связывания с CD1, а именно:

AG-HGQVDNF-SL (SEQ ID NO:1), соответствующий аминокислотам с 1127 по 1137, с подчеркнутым мотивом.

Пептид SEQ ID NO:1 эмульгируют в полном адъюванте Фрейнда и вводят подкожно в дозе 100 мкг мышам линии C57BL/6 с последующей через 2 недели такой

же инъекцией в неполном адъюванте Фрейнда. Контрольной группе вводят по той же схеме только адъювант.

Через две недели после последней инъекции обе группы мышей лечат подкожной инъекцией белка NS5 в квасцах, повторяя каждые 2 недели четыре раза.

Селезенку всех мышей получают через месяц после последней инъекции и популяцию CD3⁺-лимфоцитов выделяют с помощью сортировки FACS.

Затем клетки поддерживают в культивировании в присутствии антигенпрезентирующих клеток, нагруженных NS5, и часть активированных клеток подсчитывают через 6 дней путем включения 3H-тимидина.

Показано, что общее количество NS5-специфических клеток значительно выше у мышей, которым до вакцинации вводили CD1-рестриктированный пептид. Такое более высокое число наблюдается для клеток CD4 и, что особенно важно, высокосignificantly для клеток CD8.

В параллельных экспериментах клетки CD3⁺ инкубируют с JAWS2 в качестве презентрующих клеток. Такие клетки экспрессируют высокие уровни поверхностного CD1, но не экспрессируют комплексы MHC II типа. NS5-специфические NKT-клетки выявляют путем окрашивания антителом к PLZF и обнаруживают только в группе мышей, предварительно сенсibilizированных пептидом SEQ ID NO:1.

Таким образом, делается вывод, что предварительная инъекция CD1-рестриктированного эпитопа в адъюванте значительно усиливает общий иммунный ответ на NS5, но особенно эффективна для усиления цитотоксического иммунного ответа, характеризующегося I-рестриктированными CD8⁺ Т-клетками и NKT-клетками.

Поскольку мыши C57BL/6 и BALB/c демонстрируют различия в частоте и распределении NKT-клеток, тот же самый эксперимент повторяют на мышах BALB/c с практически такими же результатами.

Следует отметить, что очень малые различия наблюдались в количестве клеток CD4, CD8 и NKT при сравнении индивидуумов в группах, получавших предварительную инъекцию CD1-рестриктированного эпитопа, или в мышах между C57BL/6 и BALB/c, в то время как большие различия наблюдались между отдельными мышами в контрольных группах любого штамма.

Сделан вывод, что предварительная иммунизация CD1-рестриктированным пептидом не только увеличивает общий иммунный ответ на NS5, но также уменьшает различия, обычно наблюдаемые при сравнении мышей разных линий.

2. Инфекция Коксаки В4

Коксаки В4 представляет собой пикорнавирус с оцпРНК, вызывающий миокардит и панкреатит. Внутривентрикулярная инъекция определенных штаммов Коксаки, таких как В4-V, у мышей вызывает острый панкреатит, за которым немедленно следует фаза хронического воспаления. У штамма BALB/c переход острого воспаления в хроническое происходит под влиянием IL-10, типичного цитокина 2-го типа, а недостаток IL-10 приводит к abortивной форме острого воспаления и отсутствию перехода в хроническую фазу.

Хотя Коксаки В4-V активирует врожденный иммунитет, включая TLR3, TLR4 и TLR7, вирусу удается обойти этот врожденный ответ и реплицируется в ацинусах поджелудочной железы в контексте иммунного ответа Th2. Принуждение иммунного ответа к цитотоксическому ответу предотвратило бы инфекцию и/или, по крайней мере, предотвратило бы переход от острого панкреатита к хроническому.

Аминокислотная последовательность полипротеина Коксаки В4 содержит гидрофобный эпитоп EK-FRDIRGF-LA (SEQ ID NO:2), соответствующий аминокислотам с 1619 по 1629, с подчеркнутым мотивом связывания CD1.

Мышей BALB/c иммунизируют путем инъекции в стопу 100 мкг пептида SEQ ID NO:2, эмульгированного в адьюванте Фрейнда, 2 раза с интервалом в 2 недели. Контрольной группе вводят только адьювант.

Затем всех мышей иммунизируют полным полипротеином, адсорбированным на квасцах, используя 100 мкг на инъекцию, всего 4 инъекции с интервалом в 2 недели.

Через три недели после последней инъекции всех мышей заражают 50 БОЕ (бляшкообразующая единица) штаммов В4-V в брюшину.

В течение 3 дней после заражения поджелудочную железу 50% мышей выделяют и исследуют на наличие клеточной инфильтрации. У всех мышей в контрольной группе наблюдается массивная инфильтрация мононуклеарными

клетками в ацинусах. У мышей, получавших инъекции пептида SEQ ID NO:2, наблюдается умеренная инфильтрация такими клетками.

Однако на 10-й день после заражения у всех оставшихся мышей в контрольной группе наблюдается персистирующая клеточная инфильтрация с исчезновением структуры ацинусов, в то время как у мышей, предварительно обработанных пептидом SEQ ID NO:2, наблюдается полное исчезновение признаков панкреатита.

Таким образом, делается вывод, что предварительная иммунизация пептидом SEQ ID NO:2 снижает степень острого воспаления ацинусов вследствие инфекции B4-V и, что более важно, предотвращает переход в хроническую необратимую стадию панкреатита.

3. Инфекция SARS-CoV-2

SARS-CoV-2 является возбудителем пандемии коронавирусной болезни (2019 г. и позже) (CoVid-19). Наблюдения, проведенные за спонтанным иммунным ответом пациентов, указывают на глубокую дисрегуляцию как иммунного ответа, так и воспаления, связанного с неблагоприятным исходом. SARS-CoV-2 разработал несколько стратегий обхода врожденного иммунитета, что приводит к отсутствию выработки интерферона α/β и преимущественному адаптивному ответу Th2 с текущей иммунопатологией и риском антителозависимого усиления.

Переориентация ответа на эффективный врожденный иммунитет не только обеспечит значительную защиту, но и предотвратит вторичные осложнения.

Проникновение в клетки SARS-CoV-2 зависит от взаимодействия между шиповидным белком вируса (белком S) и рецептором ангиотензина 2 (ACE2). Таким образом, развитие иммунного ответа на S-белок представляет собой подходящую мишень для инфекционного контроля.

В попытке создать эффективный врожденный ответ, специфический для S-белка, пептид, включающий организованные в мотив аминокислотные остатки, подходящие для представления с помощью CD1, идентифицируют с использованием алгоритмов, описанных в патенте EP3388447 A1.

Таким образом, последовательность ATR FASVYAW NRK (SEQ ID NO:3) содержит такой мотив (подчеркнутый), соответствующий остаткам с 353 по 365 шиповидного белка SARS-CoV-2.

Пептид SEQ ID NO:3 используют для иммунизации мышей C57BL/6 в дозе 100 мкг, эмульгированных в полном адъюванте Фрейнда, с последующей второй инъекцией 100 мкг в неполном адъюванте Фрейнда через 3 недели. Контрольной группе вводят только адъювант.

Обе группы мышей затем иммунизируют 100 мкг белка S в квасцах, вводимых с 2-недельными интервалами, начиная через 3 недели после инъекции пептида SEQ ID NO:3 (или адъюванта), всего 4 инъекции с интервалом в 2 недели.

Затем оценивают иммунный ответ на S-белок на спленоцитах, полученных либо через 2, либо через 6 месяцев после последней инъекции, и оценивают титры специфических антител в сыворотке.

Показано, что мыши, предварительно обработанные пептидом SEQ ID NO:3, имеют значительно более высокие числа CD3⁺-лимфоцитов по отношению к белку S, чем контрольные мыши. Кроме того, показано, что количество CD8⁺ Т-клеток в предварительно обработанной группе превышает количество CD4⁺ Т-клеток, в то время как в контрольной группе через 2 месяца наблюдается обратное. Примечательно, что через 6 месяцев также наблюдалась та же тенденция в отношении предпочтительных CD8⁺ Т-клеток.

Титры специфических антител против белка S оценивали через 2 и 6 месяцев после окончания протокола иммунизации, демонстрируя значительно более высокие титры у мышей, предварительно обработанных пептидом SEQ ID NO:3, в обе временные точки. Изотипическое распределение антител показывает резкий сдвиг от IgG1 в контрольной группе к IgG2a в группе, предварительно обработанной пептидом SEQ ID NO:3, и этот сдвиг сохранялся через 6 месяцев.

Таким образом, делается вывод, что предварительное введение мышей пептида, содержащего CD1-совместимый мотив, повышает иммунный ответ на белок S, изменяет его характеристики в сторону повышенной цитотоксичности и Th1-зависимого ответа и поддерживает этот иммунный ответ с течением времени.

4. Вирусная инфекция гриппа

Вирусная инфекция гриппа оказывает серьезное воздействие во всем мире и приводит к значительной смертности. Одним из препятствий на пути успешной стратегии вакцинации является высокая частота мутаций вируса, вынуждающая каждый год разрабатывать новую вакцину. Кроме того, клинические и иммунологические результаты воздействия на вирус диктуются прошлой историей человека: вакцина и/или естественное воздействие на вирус реактивирует реакцию на предыдущие вирусы, явление, называемое «антигенным грехом». Это явление делает маловероятным разработку «универсальной» вакцины с использованием современных стратегий вакцинации, хотя некоторые детерминанты вируса более консервативны, чем другие, и могут быть использованы для такой вакцинации.

Создание иммунной среды, способной вызывать врожденный иммунный ответ на вирус, было бы значительным шагом вперед для создания универсальной вакцины и обладало бы свойством вытеснять характер и качество ответа, ранее дававшегося на вакцины и/или воздействие вируса.

Так, гемагглютинин вируса гриппа А содержит последовательность, соответствующую остаткам с 345 по 355:

GL-FGAIAGF-IE (SEQ ID NO:4), который демонстрирует консенсусный мотив (подчеркнут), способный активировать NKT-клетки.

Синтетический пептид, включающий SEQ ID NO:4, используют в дозе 100 мкг и эмульгируют в адъюванте Фрейнда для иммунизации мышей C57BL/6 в тропинках. Эту инъекцию повторяют через 2 недели, но с неполным адъювантом Фрейнда.

Контрольной группе мышей вводят инъекции по аналогичному протоколу, но только с адъювантом.

Через три недели после последней инъекции всем мышам вводят 100 мкг гемагглютенина, адсорбированного на квасцах, и эту инъекцию повторяют 3 раза с интервалом в две недели.

Через месяц после последней инъекции всех мышей умерщвляют и получают популяции лимфоцитов из селезенки и регионарных лимфатических узлов.

Между двумя группами мышей наблюдаются значительные количественные и качественные различия. В ответе мышей, иммунизированных пептидом SEQ ID NO:4, преобладает Th1-подобный и цитотоксический ответ на гемагглютинин, включая CD8+, NK- и NKT-клетки, что идентифицируется специфичными маркерами линии, в то время как контрольные мыши демонстрируют по существу иммунный ответ Th2-типа с небольшим участием цитотоксичности. Соответственно, продукция цитокинов иммунизированными лимфоцитами мыши демонстрирует высокое соотношение IFN-гамма к IL-4, в то время как для контрольных мышей наблюдается обратное, когда основную популяцию лимфоцитов инкубируют в присутствии гистосовместимых антигенпрезентирующих клеток, нагруженных гемагглютинином.

Изотипическое распределение антигемагглютининовых антител в сыворотке демонстрирует высокие концентрации IgG2a у мышей, иммунизированных пептидами SEQ ID NO:4, в то время как IgG1 доминирует в ответе, показанном контрольными мышами, в соответствии с доминированием Th1-подобного ответа над Th2, соответственно.

Таким образом, делается вывод, что предварительная иммунизация пептидом, активирующим NKT-клетки, изменяет качество иммунного ответа, полученного после введения гемагглютиниона, в сторону Th1-зависимого ответа и цитотоксичности.

5. Вирус простого герпеса

Альфа-вирусы простого герпеса (ВПГ) типа 1 или 2 являются вездесущими патогенами, которые сохраняются на протяжении всей жизни инфицированных людей. Они составляют пулы латентных вирусов в терминально дифференцированных нейронах периферических ганглиев. Реактивация у иммунокомпетентных лиц приводит к самоограничивающимся симптомам, которые параллельны сильному Th1-подобному и цитотоксическому иммунному ответу. Однако это не исключает серьезных симптомов, а также значительной заболеваемости, в частности, у людей с ослабленным иммунитетом. Когда вирус вступает в латентную фазу, вирусные частицы выделяются и поглощаются антигенпрезентирующими клетками ганглиев.

Сила Т-зависимой цитотоксической активности будет определять степень контроля над инфекцией.

Интересно, что ВПГ разработал стратегию предотвращения презентации вируса с помощью CD1d, указывая на важность такого пути в защите от вируса. Кроме того, были идентифицированы дополнительные механизмы предотвращения клиренса NK-клетками, и накопление клеток Th1 в месте инфекции прямо пропорционально контролю такой инфекции. В целом, усиление ответа CD1 на вирус и его последствия для активации NK-клеток представляют собой значительный шаг вперед в борьбе с инфекцией ВПГ.

Текущая вакцинация с использованием живого аттенуированного вируса индуцирует как В-, так и Т-лимфоциты, но его общая активность у пожилых составляет в лучшем случае 50%, не говоря уже о риске индуцирования потенциальной инфекции. Таким образом, существует важная неудовлетворенная медицинская потребность в стратегиях вакцинации против ВПГ.

Эпитоп из регуляторного белка транскрипции Vp16 ВПГ содержит последовательность

VL-FLHLYLF-LT (SEQ ID NO:5), соответствующий аминокислотным остаткам 179-189, с подчеркнутым мотивом связывания CD1.

Мышей BALB/c иммунизируют в тропинке 100 мкг пептида SEQ ID NO:5, эмульгированного в полном адъюванте Фрейнда, и эту инъекцию повторяют один раз через 2 недели, причем вторую инъекцию делают в неполном адъюванте Фрейнда. Контрольной группе мышей BALB/c вводят только адъювант.

Затем всем мышам дважды вводят коммерческий препарат живого аттенуированного ВПГ с интервалом в один месяц.

Через месяц после последней инъекции иммунный ответ на вакцину сравнивают между двумя группами. Показано, что предварительная иммунизация пептидом SEQ ID NO:5 смещает ответ в сторону Th1-подобного параметра, включая значительное увеличение количества клеток, обладающих потенциалом цитотоксичности, CD8+ Т-клеток, NK-клеток и NKT-клеток. Концентрация общих антител против ВПГ одинакова в 2 группах, но у предварительно иммунизированных мышей наблюдается значительно

повышенная продукция специфических антител IgG2a и IgG2b, как показано в ELISA прямого связывания.

Таким образом, делается вывод, что иммунизации пептидом, содержащим CD1-связывающий мотив, достаточно, чтобы сместить ответ в сторону приобретения свойств цитотоксичности, полезных для контроля инфекции ВПГ.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Пептид-эпитоп CD1 для применения в профилактике или лечении заболевания, вызванного внутриклеточным патогеном, причем

(i) указанное заболевание предпочтительно представляет собой вирусное заболевание, вызванное вирусом, предпочтительно выбранным из группы, состоящей из *Flaviviridae*, *Coronaviridae*, *Orthomyxoviridae*, *Herpesviridae* и *Picornaviridae*,

(ii) указанный пептид-эпитоп CD1 представляет собой фрагмент белка, экспрессируемого указанным внутриклеточным патогеном, причем указанный пептид-эпитоп CD1 содержит последовательность $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7$, где указанные X_2 , X_3 , X_4 , X_5 , и X_6 независимо представляют собой любую аминокислоту, и причем указанные остатки X_1 и X_7 независимо представляют собой {F;W;T;H или Y}, и

(iii) указанное применение включает введение указанного внутриклеточного патогена в неактивированной форме или введение второго пептида на основе белка указанного внутриклеточного патогена, причем введение указанного инактивированного внутриклеточного патогена или указанного второго пептида осуществляют после введения пептид-эпитопа CD1, и причем указанный второй пептид содержит последовательность эпитопа CD1, определенную в (ii), и по меньшей мере в одном эпитопе МНС I типа.

2. Пептид-эпитоп CD1 для применения согласно п.1, причем X_4 представляет собой {I;V;L или M}, и/или причем по меньшей мере один остаток X_1 или X_7 представляет собой {F;W или Y}, и/или причем указанная последовательность $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7$ принадлежит и/или образует или способна образовывать альфа-спираль.

3. Пептид-эпитоп CD1 для применения согласно п.1 или п.2, причем пептид-эпитоп CD1 не содержит эпитоп МНС I типа.

4. Пептид-эпитоп CD1 для применения по любому из предшествующих пп.1-3, причем пептид-эпитоп CD1 не содержит эпитоп МНС II типа.

5. Пептид-эпитоп CD1 для применения по любому из предшествующих пп.1-4, причем указанный второй пептид дополнительно содержит по меньшей мере один эпитоп МНС II типа.

6. Пептид-эпитоп CD1 для применения по любому из предшествующих пп.1-5, где указанный пептид-эпитоп CD1 может быть получен *in vitro* способом для идентификации одного или нескольких пептид-эпитопов для активации NKT-клеток в Th1-подобном и/или цитотоксическом ответе на внутриклеточный патоген, причем указанный *in vitro* способ включает стадии:

- идентификации пептидного эпитопа CD1 в указанном внутриклеточном патогене, и
- *in vitro* измерения способности идентифицированного пептидного эпитопа CD1 активировать NKT-клетки в Th1-подобном и/или цитотоксическом ответе.

7. Пептид-эпитоп CD1 для применения согласно п.6, причем в указанном *in vitro* способе активацию NKT-клеток измеряют при инкубации пептид-эпитопа с клетками, экспрессирующими молекулу CD1 на своей поверхности, с последующим добавлением популяции NKT-клеток и определением активации указанных NKT-клеток.

8. Пептид-эпитоп CD1 для применения согласно п.6 или п.7, причем в указанном *in vitro* способе идентификацию пептидного эпитопа CD1 измеряют по способности пептида внутриклеточного патогена связываться с указанной CD1 молекулой.

9. Пептид-эпитоп CD1 для применения по любому из предшествующих пп.6-8, причем в указанном *in vitro* способе активацию NKT-клеток определяют посредством количественного определения интерферона γ (IFN γ) и/или уровней интерлейкина-12 (IL-12).

10. Набор частей для применения при лечении заболевания, вызванного внутриклеточным патогеном, содержащий первый пептид, представляющий собой пептидный эпитоп CD1 по любому из предыдущих пунктов 1-9, и второй пептид, полученный из указанного внутриклеточного патогена и являющийся пептидом, содержащим указанный первый пептидный эпитоп в дополнение к другим эпитопам, предпочтительно по меньшей мере один эпитоп МНС II типа.

11. Набор частей согласно п.10, предназначенный для применения при лечении вирусного заболевания, предпочтительно выбранного из группы, состоящей из *Flaviviridae*, *Coronaviridae*, *Orthomyxoviridae*, *Herpesviridae* и *Picornaviridae*.

12. Набор частей согласно п.10 или 11, дополнительно содержащий адъювант для вакцинации первым пептидом и/или адъювант для вакцинации вторым пептидом.

13. Набор частей согласно любому из предшествующих пп.10-12, дополнительно содержащий средство для количественного определения иммуноглобулинов G (IgGs, таких как IgG2), специфичных в отношении пептидного эпитопа CD1, и/или средство для количественного определения IgG1 и/или IgG3, специфичных в отношении пептидного эпитопа CD1.

14. Набор частей согласно любому из предшествующих пп.10-13, дополнительно содержащий средства для количественного определения IL-12 IFN γ и предпочтительно IL-4, IFN α и/или IFN β .