

US PATENT & TRADEMARK OFFICE
PATENT APPLICATION FULL TEXT AND IMAGE DATABASE



(1 of 1)

Патентная Заявка Соединенных Штатов

20060257852

Код Вида

A1

Раппуоли; Рино ; и др.

16 ноября 2006 года

Тяжелый острый респираторный синдром коронавируса

Абстрактный

Вспышка вирулентного респираторного вируса, теперь известного как тяжелый острый Респираторный синдром (торс), был определен в Гонконге, Китае и а рост числа стран по всему миру в 2003 году. Изобретение относится к нуклеиновым кислотам и белкам коронавируса SARS. Эти нуклеиновые кислоты и белки можно использовать в подготовке и изготовлении вакцинных составов, диагностических реагентов, наборов и др. Изобретение также приводят способы лечения ОРВИ путем введения малых молекул противовирусные соединения, а также способы выявления сильнодействующих малых молекулы для лечения ОРВИ.

Изобретатели: **Раппуоли; Рино;** (Кастельнуово-Берарденга, Италия) ; **Massignani; Вега;** (Сиена, Италия) ; **Штадлер; Конрад;** (Scharnstein, AC) ; **Греггерсена; Йенс Петер;** (влажное, де) ; **Цзянь; Давид;** (Аламо, Калифорния) ; **Хань; Чжан;** (Лафайетт, Калифорния) ; **Поло; Джон М.;** (Данвилл, Калифорния) ; **Вайнер; Эми;** (Фэрфилд, Калифорния) ; **Хаутон; Михаил;** (Данвилл, Калифорния) ; **песни; Хен Чул;** (Беркли, Калифорния) ; **СЕО; Ми Ен;** (Соннам, Республика Корея) ; **Доннелли; Джон;** (Морага, Калифорния) ; **Кленка; Ханс Дитер;** (Марбург, Германия) ; **смельчаком; Николай;** (Фримонт, Калифорния)

Адрес Для
Переписки: **Корпорация Chiron; Интеллектуальная Собственность-R440**
Р. О. Вох 8097
Эмеривилл
ОКОЛО
94662-8097
США

Правопреемник: **Chiron Corporation**
Emeryville
CA

Family ID: **33304326**

Appl. No.: **10/822303**

Filed: **April 9, 2004**

Related U.S. Patent Documents

<u>Application Number</u>	<u>Filing Date</u>	<u>Patent Number</u>
60462218	Apr 10, 2003	
60462465	Apr 11, 2003	
60462418	Apr 12, 2003	
60462748	Apr 13, 2003	
60463109	Apr 14, 2003	
60463460	Apr 15, 2003	
60463668	Apr 16, 2003	
60463983	Apr 17, 2003	
60463971	Apr 18, 2003	
60464899	Apr 22, 2003	
60464838	Apr 22, 2003	
60465273	Apr 23, 2003	
60465535	Apr 24, 2003	
60468312	May 5, 2003	
60473144	May 22, 2003	
60495024	Aug 14, 2003	
60505652	Sep 23, 2003	
60510781	Oct 11, 2003	
60529464	Dec 11, 2003	
60536177	Jan 12, 2004	
60560757	Apr 7, 2004	

Current U.S. Class:

435/5 ; 435/325; 435/456; 435/69.3; 530/350; 536/23.72

Current CPC Class:

A61K 2039/545 20130101; A61K 39/12 20130101; C12N 2770/20022 20130101; G01N 2333/165 20130101; G01N 2469/20 20130101; A61K 2039/55566 20130101; C12N 2770/20021 20130101; C12N 2770/20043 20130101; A61K 2039/5252 20130101; A61K 2039/55505 20130101; A61K 39/215 20130101; A61K 39/00 20130101; C12N 7/00 20130101; A61K 2039/55511 20130101; C12N 2770/20034 20130101; C12N 2770/20063 20130101; C12Q 1/701

Class at Publication:

435/005 ; 435/069.3; 435/456; 435/325; 530/350; 536/023.72

International Class:

C12Q 1/70 20060101 C12Q001/70; C07H 21/04 20060101 C07H021/04; C12N 15/86 20060101
C12N015/86; C07K 14/165 20060101 C07K014/165

Claims

1. Изолированный полипептид вируса ОРВИ.
2. Полипептид по п. 1, где полипептид представляет собой Спайк (S) полипептид, полипептид Env (E), мембранный (M) полипептид, а гемагглютинин-эстеразный полипептид (он), нуклеокапсид (N) полипептид, полипептид A ORF1a, полипептид A ORF1ab, протеолитический фрагмент а Полипептид ORF1a, или протеолитический фрагмент полипептида ORF1ab.
3. Полипептид по п. 1, где полипептид содержит аминокислотная последовательность, выбранная из группы, состоящей из SEQ ID NOS: 6039, 7232, 9766, 9767, 9768, 9769, 9770, 9771, 9772, 9773, 9774, 9775, 9776, 9777, 9778, 9779, 6042, 6043, 6044, 6045, 6046, 6047, 6048, 6049, 6050 или ... 6052.
4. Полипептид по п. 1, где полипептид содержит аминокислотная последовательность, имеющая > 75% идентичности последовательности к аминокислотной последовательности выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NOS: 6042, 6043, 6044, 6045, 6046, 6047, 6048, 6049, 6050, 6052, 9766, 9767, 9768, 9769, 9770, 9771, 9772, 9773, 9774, 9775, 9776, 9777, 9778, 9779, 9997, 9998, 10149, 10316, 10338, 10339, 10340, 10341, 10342, 10532, 10533, 10571, 10572, 10573, 10574, 10575, 10576, 10577, 10578, 10579, 11561, 11562, 11618, 11619, 11620, 11627, 11630, 11633 & 11636.
5. Полипептид по п. 1, где полипептид содержит а фрагмент по меньшей мере 10 последовательных аминокислот аминокислотной последовательности выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NOS: 6042, 6043, 6044, 6045, 6046, 6047, 6048, 6049, 6050, 6052, 9766, 9767, 9768, 9769, 9770, 9771, 9772, 9773, 9774, 9775, 9776, 9777, 9778, 9779, 9997, 9998, 10149, 10316, 10338, 10339, 10340, 10341, 10342, 10532, 10533, 10571, 10572, 10573, 10574, 10575, 10576, 10577, 10578, 10579, 11552, 11561, 11562, 11618, 11619, 11620, 11627, 11630, 11633 & 11636.
6. Полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую >80% идентификация последовательности с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы состоит из SEQ ID NOS: 6042, 6043, 6044, 6045, 6046, 6047, 6048, 6049, 6050, 6052, 9766, 9767, 9768, 9769, 9770, 9771, 9772, 9773, 9774, 9775, 9776, 9777, 9778, 9779, 9997, 9998, 10149, 10316, 10338, 10339, 10340, 10341, 10342, 10532, 10533, 10571, 10572, 10573, 10574, 10575, 10576, 10577, 10578, 10579, 11552, 11561, 11562, 11618, 11619, 11620, 11627, 11630, 11633 & 11636.
7. Полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, которая содержит а фрагмент по меньшей мере 10 последовательных аминокислот аминокислотной последовательности выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NOS: 6042, 6043, 6044, 6045, 6046, 6047, 6048, 6049, 6050, 6052, 9766, 9767, 9768, 9769, 9770, 9771, 9772, 9773, 9774, 9775, 9776, 9777, 9778, 9779, 9997, 9998, 10149, 10316, 10338, 10339, 10340, 10341, 10342, 10532, 10533, 10571, 10572, 10573, 10574, 10575, 10576, 10577, 10578, 10579, 11552, 11561, 11562, 11618, 11619, 11620, 11627, 11630, 11633 & 11636.
8. Полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую >80% идентичность последовательности SEQ ID NO: 6042, и/или содержащая аминокислоту последовательность, содержащая фрагмент по меньшей мере из 10 последовательных аминокислот SEQ ID NO: 6042, где полипептид находится в форме тримера.
9. Нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид любого из пп.1-8.
10. Нуклеиновая кислота по п. 9, содержащая нуклеотидную последовательность выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NOS: 7191, 7273, 7275, 7277, 7279, 7281, 7283, 7285, 7287, 7289, 7291, 7292, 7293, 9968, 10066, 10084, 10299, 10505, 11323, 11563, 11639 & 11640.
11. Полинуклеотид, содержащий последовательность нуклеотидов, имеющую >80% идентичность последовательности к нуклеиновой кислоте по п. 9 или п. 10.
12. Полинуклеотид, содержащий фрагмент по меньшей мере из 10 последовательных нуклеотиды нуклеиновой кислоты по п. 9 или п. 10.
13. Антитело, которое распознает полипептид любого из пунктов от 1 до 8.
14. Антитело по п. 13, в котором указанное антитело распознает полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6042 или а фрагмент его.
15. Антитело по п. 14, в котором указанное антитело распознает полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6042 или а фрагмент его в тримерной форме.
16. Антитело по п. 13, где антитело является моноклональным антителом.
17. Антитело по п. 13, где антитело является антителом человека.
18. Иммуноферментный анализ для определения антигена вируса ОРВИ в образце, состоит из стадии контактирования образца с антителом любого из них из претензий 13-17.
19. Иммуноферментный анализ для определения антитела против антигена вируса ОРВИ в образце, состоящем из этапа контактирования образца с полипептид любого из ПП. 1-8.
20. Способ определения антитела против антигена вируса ОРВИ в организме человека образец, содержащий контактирование указанного образца С полипептидом любого из них ПП. 1-8, при условиях, пригодных для связывания указанного полипептида к указанному антителу, если таковое имеется, и обнаружение его связывания полипептид к указанному антителу.
21. Способ определения антигена вируса ОРВИ в образце, содержащем контакт указанного образца с антителом любого из пп. 13-17, в условиях, пригодных для связывания указанного антитела с указанным антигеном, если присутствует, а также выявляет связывание указанного антитела с указанным антигеном.
22. Вакцина для лечения или профилактики тяжелого острого респираторного заболевания синдром (атипичная пневмония), включающий инактивированный вирус атипичной пневмонии, убитый вирус острой пневмонии вирус, ослабленный вирус атипичной пневмонии, разделенный препарат вируса атипичной пневмонии, или при по крайней мере, один очищенный вирус ОРВИ антигенов.
23. Вакцина по п. 22, содержащая очищенный полипептид, согласно к любому из пп. 1-8.
24. Вакцина по п. 22 или п. 23, где антиген представляет собой очищенный антиген вируса ОРВИ в виде ВЛП.

25. Вакцина по любому из пп. 22-24, дополнительно содержащая вспомогательный.
26. Вакцина по п. 25, где адьювантом является соль алюминия, или это MF59.
27. Вакцина по любому из пп. 22-26, содержащая более одного лекарственного средства Антиген вируса ОРВИ.
28. Вакцина по п. 27, где антигены выбраны из S, E, H и M.
29. Вакцина по п. 22, содержащая инактивированный вирус ОРВИ.
30. Вакцина по п. 29, в которой указанный вирус инактивирован посредством химические или физические средства.
31. Вакцина по п. 30, где указанная инактивация содержит лечение вируса с эффективным количеством одного или нескольких из следующих компонентов: следующие агенты, выбранные из группы, состоящей из моющих средств, формальдегид, формалин, .бета.- пропиолактон, и ультрафиолетовый свет.
32. Вакцина по п. 30, где указанная инактивация содержит лечение вируса с эффективным количеством одного или нескольких из следующих компонентов: следующие агенты, выбранные из группы, состоящей из метиленового синего, псорален и карбоксифуллерен (C60).
33. Вакцина по п. 30, где указанная инактивация содержит лечение вируса с эффективным количеством одного или нескольких из следующих компонентов: следующие агенты, выбранные из группы, состоящей из бинарного этиламина, ацетилэтиленимин и гамма-облучение.
34. Вакцина по п. 31, где указанная инактивация содержит лечение С.бета.- пропиолактон.
35. Вакцина по п. 34, где указано .бета.- используется пропиолактон в концентрации от 0,01 до 0,5%.
36. Вакцина по п. 34, где указано .бета.- используется пропиолактон в концентрации от 0,5 до 0,2%.
37. Вакцина по п. 34, где указано .бета.- используется пропиолактон при концентрации от 0,025 до 0,1%.
38. Способ инактивации вируса атипичной пневмонии, включающий воздействие на него инактивирующий агент в течение 12-24 часов при температуре охлаждения с последующим гидролизом любого остаточного инактивирующего агента путем поднятия температура в течение трех часов.
39. Способ по п. 38, в котором инактивирующий агент является .бета.- пропиолактон.
40. Способ по п. 38, где температура охлаждения равна между 0.степень. С. и 8.степень. С.
41. Способ по п. 38, в котором повышенная температура находится между 33.степень. С. и 41.степень. С.
42. Способ получения инактивированной вакцины против ОРВИ, содержащей: а. инъекции культуры клеток млекопитающих вирусом SARS; b. культивирование инфицированные клетки; с. сбор супернатанта, содержащего вирус ОРВИ; d. инактивация вируса атипичной пневмонии; и e. очистка инактивированного вируса атипичной пневмонии вирус.
43. Способ по п. 42, где указанная культура клеток млекопитающих является производные от одного или нескольких типов ячеек, выбранных из группы состоит из клеток фибробластов, эндотелиальных клеток, гепатоцитов, кератиноциты, иммунные клетки, клетки молочной железы, гладкомышечные клетки, клетки меланоцита, нервные клетки, клетки простаты, ренальные клетки, скелетные клетки, клетки печени, клетки ретинобласта и стромальные клетки.
44. Способ по п. 42, где указанная культура клеток млекопитающих является полученный из культуры клеток, выбранных из группы, состоящей из человека клетки, нечеловеческие клетки приматов, клетки HeLa, человеческие диплоидные клетки, фетальные клетки легкого резуса, клетки почки человека эмбриональные, клетки VERO, клетки лошади, клетки коровы, клетки овцы, клетки собаки, клетки кота или клетки грызуна.
45. Способ по п. 42, где указанная культура клеток млекопитающих является выведено от клеток VERO или фетальных клеток почки rhesus.
46. Способ по п. 42, в котором указанные клетки млекопитающих культивируют внутри сывортка свободных средств массовой информации.
47. Способ по п. 42, в котором указанные клетки млекопитающих культивируют внутри средства массовой информации протеина свободные.
48. Способ по п. 42, где указанная прививочная стадия содержит поглощение вируса ОРВИ на клеточную культуру в течение 60-300 минут.
49. Способ по п. 42, в котором указанную стадию инокуляции проводят при 25.степень. С. до 40.степень. С.
50. Способ по п. 42, в котором указанная стадия очистки содержит один или несколько процедур, выбранных из группы, состоящей из градиента центрифугирование, ультрацентрифугирование, непрерывное ультрацентрифугирование, хроматография, осаждение полиэтиленгликоля и сульфата аммония осадок.
51. Способ по п. 42, в котором указанная стадия очистки содержит один или больше из обработок выбранных от группы состоя из ультрафильтрация и диалфильтрация.
52. Способ по п. 50, в котором проводят указанную хроматографическую обработку включает в себя одну или несколько хроматографических процедур, выбранных из группа, состоящая из ионообменной хроматографии, исключение размера хроматография, и жидкостная хроматография средства.
53. Способ по п. 52, в котором проводят указанную хроматографическую обработку включает использование еще одной хроматографической смолы, выбранной из группы состоит из анионной смолы и катионной смолы.
54. Способ по п. 52, в котором проводят ионообменную хроматографию лечение включает в себя первый этап с использованием сильной анионообменной смолы и а второй шаг-использование сильной катионообменной смолы.
55. Способ по п. 50, в котором используют указанное градиентное центрифугирование стадия очистки включает центрифугирование по градиенту плотности.
56. Способ по п. 42, в котором указанная стадия очистки содержит первая стадия хроматографической очистки и вторая стадия градиентной центрифугирование.
57. Способ по п. 56, где указанная первая хроматография стадия очистки включает жидкостную аффинную хроматографию.

58. Способ по п. 56, в котором осуществляют второе градиентное центрифугирование стадия включает центрифугирование по градиенту плотности.
59. Одноцепочечный олигонуклеотид, содержащий последовательность нуклеотидов выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NOS: 21-6020, 6076-6568, 6586-6587, 7292-7301, 7325-7328, 7332-7352, 7353-7385, 10235-10298, 10352-10504, 10580-11322 и 11325-11551.
60. Одноцепочечный олигонуклеотид, содержащий комплемент олигонуклеотид по п. 59.
61. Олигонуклеотид по п. 59 или п. 60, содержащий 10-30 нуклеотиды.
62. Олигонуклеотид по п. 61, содержащий последовательность нуклеотидов SEQ ID NO: 7292, SEQ ID NO: 7293, дополнение SEQ ID NO: 7292 или комплектация SEQ ID NO: 7293.
63. Набор, содержащий праймеры для усиления содержащейся последовательности шаблонов внутри мишени нуклеиновой кислоты вируса атипичной пневмонии, набор, содержащий первую праймер и второй праймер, где первый праймер содержит последовательность существенно дополняющие часть указанной последовательности шаблонов и второй праймер содержит последовательность, существенно дополняющую а часть дополнения к указанной шаблонной последовательности, где последовательности внутри указанных праймеров, обладающие существенной комплементарностью определите конечные точки последовательности шаблонов, которая должна быть усилена.
64. Комплект по п. 63, в котором содержится последовательность шаблонов в пределах SEQ ID NO: 1 и/или SEQ ID NO: 2.
65. Комплект по п. 63 или п. 64, в котором первый праймер содержит а фрагмент из 8 и более нуклеотидов SEQ ID NO: 1, а также второй праймер содержит фрагмент из 8 и более нуклеотидов комплемента SEQ ID Нет: 1.
66. Комплект по п. 63 или п. 64, в котором первый праймер содержит а фрагмент из 8 и более нуклеотидов SEQ ID NO: 2, а также второй праймер содержит фрагмент из 8 и более нуклеотидов комплемента SEQ ID Нет: 2.
67. Набор по п. 63, где первый праймер представляет собой олигонуклеотид согласно любому из пунктов 59-62 и второму праймеру является олигонуклеотид по любому из пп.59-62.
68. Комплект любого из пунктов 63-67, дополнительно содержащий маркировку зонд, содержащий либо фрагмент из 8 или более нуклеотидов SEQ ID NO: 1 и / или SEQ ID NO: 2, или дополнение указанного фрагмента, которое фрагмент находится в пределах последовательности шаблонов.
69. Набор по любому из пунктов 63-68, где первый праймер и / или второй праймер содержит нуклеотидную последовательность, выбранную из группа, состоящая из SEQ ID NOS: 21-6020, 6076-6568, 6586-6587, 7292-7301, 7325-7328, 7332-7352, 7353-7385, 10235-10298, 10352-10504, 10580-11322 и 11325-11551.
70. Набор по любому из пунктов 63-68, где первый праймер и / или второй праймер содержит комплемент нуклеотида последовательность, выбранная из группы, состоящей из SEQ ID NOS: 21-6020, 6076-6568, 6586-6587, 7292-7301, 7325-7328, 7332-7352, 7353-7385, 10235-10298, 10352-10504, 10580-11322 и 11325-11551.
71. Способ определения наличия вируса ОРВИ в образце включающий предоставление образца, подозреваемого в содержании вируса SARS мишень нуклеиновой кислоты, усиливающая последовательность шаблона, содержащуюся в ней Мишень нуклеиновой кислоты вируса ОРВИ с набором любого из п. 63 к 70, и обнаруживать усиленную последовательность шаблона, где присутствие амплифицированная последовательность шаблона указывает на наличие вируса ОРВИ в указанном образце.
72. Способ по п. 71, в котором указанное усиление осуществляют с использованием полимеразная цепная реакция, транскрипционная опосредованная амплификация, обратная транскрипция ПЦР, лигазная цепная реакция, смещение нитей амплификация или амплификация на основе последовательности нуклеиновых кислот.
73. Двухцепочечная молекула РНК длиной примерно от 10 до около 30 нуклеотидов, которые способны инактивировать коронавирус SARS в а клетка млекопитающих.
74. Двухцепочечная РНК по п. 73, в которой последовательность одного из нити по меньшей мере на 90% идентичны целевой последовательности, при этом целевая последовательность представляет собой фрагмент SEQ ID NO: 1 и/или SEQ ID NO: 2.
75. Двухцепочечная РНК по п. 73 или п. 74, где целевой объект последовательность, содержащая нуклеотидную последовательность, выбранную из группы состоит из SEQ ID NOS: 7292, 7293, 7294, 7295, 7296, 7297, 7298, 7299, 7300 и 7301.
76. Двухцепочечная РНК любого из пп. 73-75, содержащая не менее хотя бы один модифицированный нуклеотид.
77. Способ лечения пациента, страдающего ОРВИ, включающий в себя:: введение пациенту терапевтически эффективной дозы а молекула менее 1000 г / моль.
78. Способ по п. 77, где молекула имеет ароматическую область и больше, чем один гетероатом, выбранный из О, S или N.
79. Способ лечения пациента, страдающего ОРВИ, включающий в себя:: введение пациенту терапевтически эффективной дозы а соединение, выбранное из: аналога нуклеозида, пептоида, олигопептида, полипептид а ингибитор протеазы, ЗС-подобный ингибитор протеазы, а папаин-подобный ингибитор протеазы, или ингибитор РНК-зависимой РНК полимеразный.
80. Способ лечения пациента, страдающего ОРВИ, включающий в себя:: введение пациенту стероидного противовоспалительного препарата в виде комбинация с по крайней мере одним противовирусным соединением.
81. Способ лечения пациента, страдающего ОРВИ, включающий в себя:: введение пациенту терапевтически эффективной дозы а соединение, выбранное из: ацикловира, ганцикловира, видарабидина, фоскамета, цидофовир, амантидин, Рибавирин, трифтортимидин, зидовудин, диданозин, залцитабин, противовирусное соединение, указанное в Таблице 1; an противовирусное соединение, указанное в таблице 2; или интерферон.
82. Способ по п. 81, в котором интерферон представляет собой интерферон-.альфа. или интерферон-.бета..
83. Способ получения любого из пп. 77-82, где молекула или смесь поставлена вдыханием.
84. Способ идентификации терапевтически активного агента, содержащего этапы: а) контакт терапевтически активного агента с клеткой инфицированных вирусом атипичной пневмонии; (b) измерение ослабления атипичной пневмонии, связанной фермент.
85. Вирусный вектор или частица для доставки in vivo нуклеиновых кислот пункт 9 или пункт 10.
86. Вирусный вектор по п. 85, где вектор представляет собой аденовирус вектор, вектор вируса оспы или вектор альфавируса.

87. Частица реплик альфавируса, содержащая один или несколько вирусов SARS антигены.
88. Частица репликона по п. 87, где указанный вирусный антиген SARS является спайковый белок.
89. Частица репликона по п. 87, где указанная частица содержит а репликон, полученный из венесуэльского энцефалита лошадей (VEE) и далее содержит оболочку, полученную из вируса Синдбуса (SIN) или леса Семлики Вирус (SFV).
90. Вакцина, содержащая один или более антигенов вируса торс и один или более антигенов вируса ОРВИ антигены респираторных вирусов.
91. Вакцина по п. 90, где указанные антигены респираторного вируса являются выделен из группы, состоящей из вируса гриппа, риновируса человека (BCP), вирус парагриппа (PIV), респираторно-синцициальный вирус (RSV), аденовирус, метапневмовирус и риновирус.
92. Вакцина по п. 91, где указанный респираторный вирусный антиген является от вируса гриппа.
93. Вакцина по п. 90, где указанный респираторный вирусный антиген является от коронавируса, отличного от вируса атипичной пневмонии.
94. Полипептид, содержащий иммуногенный, поверхностно экспонированный фрагмент последовательность аминокислот SEQ ID NO: 6042.
95. Полипептид по п. 94, где указанный фрагмент не включает последние 50 аминокислот C-конца SEQ ID NO: 6042.
96. Полипептид по п. 94, где указанный фрагмент не включает а transdomain регион SEQ ID нет: 6042.
97. Полипептид по п. 94, где указанный фрагмент не включает а C-terminus цитоплазматический домен SEQ ID NO: 6042.
98. Полипептид по п. 94, где указанный фрагмент не включает а N-конечная последовательность сигналов.
99. Изолированный полинуклеотид, содержащий последовательность нуклеиновых кислот выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NOS: 9968 и 10066.
100. Полинуклеотидные п. 99, отличающийся тем, что полинуклеотидные содержащая последовательность нуклеиновых кислот, имеющую > 80% идентичности последовательности к а полинуклеотидная последовательность, выбранная из группы, состоящей из SEQ ID NOS: 9968 и 10066.
101. Изолированный полинуклеотид, содержащий фрагмент по меньшей мере 15 последовательные нуклеиновые кислоты последовательности нуклеиновых кислот, выбранной из группа, состоящая из SEQ ID NOS: 9968 и 10066 и где указанный фрагмент не состоит полностью из SEQ ID NO: 10033.
102. Выделенный полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, кодируемую посредством любая из претензий 99-101.
103. Полипептид по п. 102, содержащий аминокислотную последовательность выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NOS: 9969-10032, 10067 и 10015.
104. Полипептид по п. 103, где аминокислотная последовательность равна выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NOS: 9997, 9998 и 10015.
105. Экспрессионная конструкция для рекомбинантной экспрессии вируса ОРВИ спайковый белок, где указанная конструкция содержит последовательность нуклеиновых кислот выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NOS: 6578-6583.
106. Клеточная линия млекопитающих, стабильно экспрессирующая вирусный антиген SARS.
107. Клеточная линия по п. 106, где указанная клеточная линия является китайской Клетка яичника хомяка (чо).
108. Клеточная линия по п. 106, в которой вирусный антиген SARS представляет собой спайковый белок или его фрагмент.
109. Клеточная линия по п. 106, в которой спайковый белок усечен чтобы удалить трансмембранную последовательность.
110. Способ идентификации терапевтически активного агента, содержащего шаги: (а) контакт терапевтически активного агента с буфером содержит фермент SARS; и (b) измерение ослабления фермента SARS.
111. Способ по п. 110, в котором фермент SARS представляет собой протеазу SARS.
112. Способ по п. 111, в котором буфер дополнительно содержит а пептид с атипичной протеазой расщепляют сайт.
113. Способ по п. 110, в котором измерение производится по формуле: измерение флуоресценции.
114. Вакцина по одному из пп. 22-37 и 90-93 дополнительно содержит: вспомогательное средство.
115. Вакцина по п. 114, в которой адьювантом является SMIP.
116. Вакцина по п. 115, в которой соединение SMIP выбрано из группа, состоящая из ацилпиперазина, триптантрина, Ан индолдион, тетрагидроизохинолин, бензоциклодион, амино азавинильное соединение, тиосемикарбазон, лактам, аминокбензимидазол хинолинон, гидроталамид, бензофенон, изоксазол, стерол, а хиназолинон, пирол, антрахинон, хиноксалин, триазин, Ан бензазол и пиразолопиримидин, или фармацевтически приемлемый соль, сложный эфир или их пролекарство.
117. Способ вакцинации субъекта, включающий введение вакцины по одной из претензий 22-37 и 90-93.
118. Способ по п. 117 дополнительно включающий введение SMIP.
119. Способ лечения пациента по одному из пунктов 77-82 дополнительно состоит из введения по меньшей мере одного соединения SMEP.
120. Способ лечения пациента по одному из пунктов 77-82 дополнительно состоит из введения по меньшей мере одного соединения SMIS.

Description

[0001] все документы, приведенные в настоящем документе, включены путем ссылки в их целостность.

СВЯЗАННЫЕ ЗАЯВКИ, ИЗ КОТОРЫХ ИСПРАШИВАЕТСЯ ПРИОРИТЕТ

[0002] это приложение включает в себя ссылку в полном объеме США. предварительная заявка на патент 60/462, 218, Адвокатская справка№. PP20474. 001, подано в апреле. 10, 2003 по экспресс-почте с почтой США офис, США предварительная заявка на патент 60/462, 465, адвокат Ссылка Нет. PP20480. 001, подано в апреле. 11, 2003 через срочную почту с почта США, США предварительная заявка на патент 60/462, 418, Адвокатская Справка Нет. PP20480. 002, подано в апреле. 12, 2003 через Экспресс Почта с почтой США, временная патентная заявка США 60/462, 748, Адвокатская Справка№. PP20480. 003, подано в апреле. 13, 2003 через срочную почту с почтой США, патент США временный заявление 60/463, 109, Адвокатская справка№. PP20480. 004, подано в апреле. 14, 2003 через срочную почту с почтовым отделением США, США временное патентная заявка 60/463, 460, Адвокатская справка№. PP20480. 005, поданный на апрель. 15, 2003 по экспресс-почте с почтой США, США предварительная заявка на патент 60/463, 668, Адвокатская справка№. PP20480. 006, подано в апреле. 16, 2003 по экспресс-почте с почтой США офис, США предварительная заявка на патент 60/463, 983, адвокат Ссылка Нет. PP20480. 007, подано в апреле. 17, 2003 через срочную почту с почта США, США предварительная заявка на патент 60/463, 971, Адвокатская Справка Нет. PP20480. 008, подано в апреле. 18, 2003 через Экспресс Почта с почтой США, временная патентная заявка США 60/464, 899, Адвокатская Справка№. PP20480. 009, подано в апреле. 22, 2003 через срочную почту с почтой США, патент США временный заявление 60/464, 838, Адвокатская справка№. PP20507. 001, подано в апреле. 22, 2003 по экспресс-почте с почтовым отделением США, США временный патентная заявка 60/465, 273, Адвокатская справка№. PP20518. 001, поданный на апрель. 23, 2003 по экспресс-почте с почтой США, США предварительная заявка на патент 60/465, 535, Адвокатская справка№. PP20518. 002, подано в апреле. 24, 2003 по экспресс-почте с почтой США офис, США предварительная заявка на патент 60/468, 312, адвокат Ссылка Нет. PP20480. 010, поданное 5 мая 2003 года по экспресс почте с Почтовое отделение США, и заявка на временный патент США 60/473, 144, Адвокатская Справка Нет. PP20480. 011, поданный 22 мая 2003 года, США. предварительная заявка на патент 60/495, 024, Адвокатская справка№. PP20480. 012, подано в августе. 14, 2003 по экспресс-почте с почтой США ведомство, США временная патентная заявка 60/505, 652, адвокат Ссылка Нет. PP20480. 013, подано в сентябре. 23, 2003 через срочную почту с почта США, США предварительная заявка на патент 60/510, 781, Адвокатская Справка Нет. PP20480. 014, подано в октябре. 11, 2003 через Экспресс Почта с почтой США, временная патентная заявка США 60/529, 464, Адвокатская Справка№. PP20480. 015, поданный на Дек. 11, 2003 через срочную почту с почтой США, патент США временный заявление 60/536, 177, Адвокатская справка№. PP20480. 016, подано в январе. 12, 2004 через срочную почту с почтовым отделением США, и США временное патентная заявка 60/____, Адвокатская справка№. PP20480. 017, поданный на апрель. 7, 2004 по экспресс-почте с почтой США.

ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0003] изобретение относится к нуклеиновым кислотам и белкам из тяжелых Вирус острого респираторного синдрома (ОРВИ). Эти нуклеиновые кислоты и белки может быть использован при приготовлении и изготовлении вакцинных составов для лечения или профилактики ОРВИ. Изобретение также относится к области диагностические реагенты, наборы (содержащие такие реагенты) и способы, которые может использоваться для диагностики или определения наличия или отсутствия тора вирус в биологическом образце. Изобретение также относится к способам получения лечение или профилактика ОРВИ с использованием малых вирусных молекул ингибиторы и комбинации мелкомолекулярных вирусных ингибиторов и наборов за предательство ОРВИ.

ПРЕДЫСТОРИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0004] вспышка вирулентного респираторного вируса, в настоящее время известного как тяжелый Острый респираторный синдром (торс), был определен в Гонконге, Китае и ряд других стран по всему миру в 2003 году. Пациенты типично имел симптомы включая лихорадку, сухой кашель, одышку, головную боль, и гипоксемия. Изоляты вируса тора, по-видимому, имеют гомологию с АТ по крайней мере, ген РНК-полимеразы нескольких известных коронавирусов. Один филогенетический анализ этой гомологии представлен в работе Peiris et al., "Коронавирус как возможная причина тяжелого острого респираторного синдрома", Ланцет, опубликованный на сайте апр. 8, 2003 at <http://image.thelancet.com/extras/03art3477web.pdf>, включенный здесь по ссылке в полном объеме. Другие секвенированные фрагменты вируса тора геном, по-видимому, перекрывается с открытой рамкой считывания 1В коронавирусов. Смотрите, Дростен и др., "Идентификация нового коронавируса у пациентов с тяжелым острым респираторным синдромом", New England Journal of Medicine, опубликовано на сайте: <http://www.nejm.org> на апрель. 10, 2003, incorporated здесь по ссылке в полном объеме.

[0005] научный центр генома в Британской Колумбии, Канада опубликовано на его сайт (<http://www.bcsc.ca/bioinfo/SARS/>) проект геномной ассамблеи из 29 736 пар оснований вируса, который считается вирусом атипичной пневмонии, называют как изолировать TOR2. Этот проект генома ассамблеи приводится здесь как SEQ ID Нет: 1.

[0006] Центр по контролю и профилактике заболеваний (CDC) опубликовал нуклеотид последовательность штамма SARS-CoV (SEQ ID NO: 2) на его веб-сайте (<http://www.cdc.gov/ncidod/sars/pdf/nucleoseq.pdf>). CDC имеет также опубликовано филогенетическое дерево прогнозируемых N, S и М белков (прилагается как рис. 6). Это дерево помещает вирус SARS вне любого из ранее известны группы коронавирусов.

[0007] существует растущая потребность в профилактических или терапевтических вакцинах против вируса ОРВИ, а также методов диагностики и скрининга и композиции для определения наличия вируса, например, у млекопитающих ткань или сыворотка.

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0008] изобретение относится к нуклеиновым кислотам и белкам из тяжелых Вирус острого респираторного синдрома (ОРВИ). Эти нуклеиновые кислоты и белки может быть использован при приготовлении и изготовлении вакцинных составов для лечения или профилактики ОРВИ. Такие вакцинные составы могут включите инактивированный (или убитый) вирус SARS, ослабленный вирус SARS, расщепленный препарат вируса ОРВИ и рекомбинантная или очищенная субъединица формулировка одного или нескольких вирусных антигенов ОРВИ. Самовыражение и доставка полинуклеотиды данного изобретения могут быть облегчены с помощью вирусных векторы и / или вирусные частицы.

[0009] изобретение также относится к диагностическим реактивам, наборам (содержащие такие реагенты) и способы, которые могут быть использованы для диагностики или определить наличие или отсутствие вируса ОРВИ в биологическом образце. Изобретение дополнительно включает не кодирующий вирусный полинуклеотид SARS последовательности, кодирующие вирусные последовательности SARS для неиммунных белков, консервированные и варианты вирусные полинуклеотидные последовательности SARS для использования в них диагностические композиции и методы.

[0010] изобретение также относится к вакцинным препаратам, содержащим один или несколько антигенов вируса ОРВИ и один или несколько других респираторных вирусов антигены. Дополнительные респираторные вирусные антигены, пригодные для использования в изобретение включает антигены вируса гриппа, риновируса человека (HRV), вирус парагриппа (PIV), респираторно-синциальный вирус (RSV), аденовирус, метагеммовирус и риновирус. Дополнительный респираторный вирусный антиген может также быть от коронавируса, отличного от коронавируса SARS. Предпочтительно, дополнительным респираторным вирусным антигеном является грипп вирусный антиген.

[0011] композиции изобретения могут дополнительно содержать один или более компонентов вспомогательное средство. Адьюванты, пригодные для использования в изобретении, включают слизистую оболочку, трансдермальные или парентеральные адьюванты. Адьюванты слизистой оболочки, пригодные для использования в изобретение входят детоксицированные бактериальные АДФ-рибозилирующие токсины, как токсиды жары E. coli лабильные (например, LTK63), хитозан и их производные и нетоксичные двойные мутантные формы Bordetella коклюшные анатоксины. Парентеральные адьюванты, пригодные для применения в изобретении включите MF59 и соли алюминия или алюминия.

[0012] изобретение также предоставляет способы лечения тора путем введение мелкомолекулярных соединений, а также способы идентификации мощные малые молекулы для обработки SARS.

[0013] в одном из аспектов изобретения способ идентификации а предоставляется терапевтически активное средство, включающее: (а) контакт с терапевтически активное вещество с клеткой, инфицированной вирусом ОРВИ; б) измерение ослабления связанного с тора фермента.

[0014] в более частном варианте осуществления, терапевтически активное вещество это очень маленькая молекула. В другом более конкретном варианте

осуществления, the терапевтически активным веществом является аналог нуклеозида. В другом больше частный вариант осуществления терапевтически активным веществом является пептид, олигопептид, или полипептид. В другом варианте осуществления атипичная пневмония связана фермент-это протеаза SARS. В другом варианте осуществления связанный с SARS энзим является Атипичная полимеразы. В еще одном варианте осуществления связанный с SARS энзим является а киназа. Способы идентификации терапевтически активных агентов для лечение вирусной инфекции торс далее обсуждаются в разделе V ниже.

[0015] в другом аспекте изобретения способ лечения человека инфицированный торс обеспечивается введением небольшой молекулы к пациенту, который в этом нуждается. В одном варианте осуществления мелкая молекула представляет собой ингибитор протеазы SARS. В другом варианте осуществления маленькая молекула является ингибитор полимеразы SARS. В другом варианте осуществления атипичная пневмония связана фермент представляет собой киназу. В еще одном варианте осуществления маленькая молекула является вводят внутрь или парентерально.

[0016] изобретение также предусматривает использование таких малых молекул в составе производство лекарственного средства для лечения тяжелых острых респираторных заболеваний синдром.

[0017] к Мелкомолекулярным соединениям настоящего изобретения относятся следующие: менее 1000 г/моль, предпочтительно с ароматической областью и более один гетероатом, выбранный из O, S или N. предпочтительные малые молекулы включают, но не ограничиваются ацикловиrom, ганцикловиром, видарабином, фоскамет, цидофовир, амантидин, Рибавирин, трифтортимидин, зидовудин, диданозин, залцитабин и их комбинации. Интерфероны могут также использоваться для лечения пациентов, в том числе интерферон-альфа. и интерферон-тоже.бета.. Лечение интерфероном показало: перспектива в лечении ОРВИ у обезьян (Enserink (2004) Science 303:1273-1275), особенно при пегилировании (Haagmans et al. (2004) Медицина Природы 10: 290-293).

[0018] один из аспектов настоящего изобретения относится к способам идентификация лиц, подвергшихся воздействию, и биологических образцов, содержащих Вирус ОРВИ (SARSV), а также к наборам для проведения своих методов. Такой методы могут использовать методы обнаружения нуклеиновых кислот, такие как ПЦР, РТ-ПЦР (Коронавириды-это РНК-вирусы), транскрипционно-опосредованная амплификация (ТМА), лигазная цепная реакция (LCR), усиление сигнала разветвленной ДНК анализы, амплификация на основе последовательности изотермических нуклеиновых кислот (NASBA), другие автономные анализы репликации последовательности, ДНК бумеранга амплификация, активация Стренг-смещения, задействуя технология зонда, или комбинации таких методов усиления. Такая нуклеиновая кислота методы обнаружения используют олигонуклеотиды, имеющие нуклеотидную последовательность подобный или комплементарный вирусному геному SARS, как праймеры (например, для усиления) и в качестве зондов (например, для захвата или обнаружения), как это хорошо известен в искусстве.

[0019] альтернативно, или в дополнение к обнаружению нуклеиновой кислоты способы, описанные выше, способы настоящего изобретения могут быть использованы различные методы иммуноанализа для обнаружения антигенов SARSV и/или антитела.

[0020] соответственно, настоящее изобретение относится к способам идентификация лиц, подвергшихся воздействию SARSV, или биологических образцов содержащие SARSV, путем определения наличия антигенов SARSV с использованием антитела которые специфически связывают к таким же. Антителами являются: предпочтительно моноклональные антитела. Количественное определение количества вируса антигены присутствующие в образце индивидуала могут быть использованы в определять прогноз зараженного человека. Предпочтительно, антигены SARSV быть обнаруженным вообще один из структурных протеинов, в частности те, которые присутствуют на поверхности вирусных частиц и включают, например: пример, гликопротеин (Б) шипа, также вызванный E2; конверт (небольшой мембранный) белок (Е), также называемый sM; мембранный гликопротеин (М), также вызванный E1; гликопротеид геммагглютинин-эстеразы (он); также названный E3; и фосфопротеин нуклеокапсида (Н). В предпочтительном варианте варианты осуществления, антигены, подлежащие обнаружению, являются белками S, Е и М используя антитела к тому же самому.

[0021] настоящее изобретение относится к наборам для идентификации личности CAPCB и реагенты, используемые в таких наборах. Наборы состоят из первого контейнера который содержит антитела, которые специфически связываются с антигеном SARSV и второй контейнер, который содержит антиген SARSV. Антителами являются: предпочтительно моноклональные антитела. Комплекты могут быть адаптированы для количественной оценки количества антигена в пробе одного человека. Такая информация может быть использованы при определении прогноза инфицированного лица.

[0022] настоящее изобретение относится к способам идентификации лица, подверженные воздействию вируса торс, или биологические образцы, содержащие SARSV, путем обнаружения наличия антител против антигена вируса SARS в пробе используют антиген ОРВИ. Количественное определение количества анти-атипичной пневмонии белок от атипичных антител, присутствующих в образце конкретного человека, может быть используется при определении прогноза инфицированного лица. Любой из них или больше вирусных белков (структурных белков или неструктурных белки) могут быть использованы в качестве антигена для обнаружения антител SARSV; предпочтительно антиген SARSV, который сохраняется среди изолятов SARSV является предпочтительный. В этом отношении неструктурный белок (например, Pol, Hel, 3CLp, MP, PLP1, PLP2) может быть особенно полезным.

[0023] настоящее изобретение относится к наборам для идентификации лиц подвергается воздействию ОРВИ и используемых в ней реагентов. Наборы состоят из первого контейнер, содержащий антитела, которые были получены в ответ на подвержение к антигену от вируса SARS и второго контейнера который содержит антиген(ы) SARS. Эти комплекты могут быть адаптированы для количественной оценки количество анти-SARS антител, присутствующих в образце человека. Такой информация может быть использована при определении прогноза инфицированного индивидуальной.

[0024] настоящее изобретение относится к способам идентификации лица, подверженные воздействию вируса торс, или биологические образцы, содержащие SARSV, путем обнаруживать присутствие нуклеиновой кислоты от вируса SARS. Количественное определение количества нуклеиновой кислоты SARS присутствующей в образце индивидуум может быть использован в определении прогноза инфицированного индивидуальной. Способы используют олигонуклеотидные зонды и / или праймеры которые являются сходными или комплементарными по последовательности к геному SARSV или продукты транскрипции или репликации. Предпочтительными зондами и грунтками являются описано здесь. Также в настоящее изобретение включены комплекты для проводятся методы детекции нуклеиновых кислот SARSV.

[0025] изобретение дополнительно включает способ обработки и/или профилактики ОРВИ путем назначения терапевтического средства эффективное количество по крайней мере одного противовирусного соединения из их числа описанный в патентах США и опубликованный международный патент приложения, перечисленные в Таблице 1 и Таблице 2. В одном варианте осуществления метод, противовирусное соединение представляет собой небольшую молекулу. В другом вариант осуществления, противовирусное соединение является ингибитором протеазы. В дальнейшем вариант осуществления, противовирусный ингибитор протеазы представляет собой ЗС-подобную протеазу ингибитор и / или папаиноподобный ингибитор протеазы. В другом варианте осуществления, противовирусное соединение является ингибитором РНК-зависимой РНК полимеразы. В другом варианте осуществления, первая противовирусная смесь которая А ингибитор протеазы вводят со вторым противовирусным соединением, которое является РНК-зависимым ингибитором РНК-полимеразы. Изобретение далее предусматривает введение стероидного противовоспалительного препарата в комбинация по меньшей мере с одним противовирусным соединением, например, из противовирусные соединения, описанные в документах, перечисленных в Таблице 1 и Таблица 2.

[0026] изобретение дополнительно предусматривает способ обработки и / или профилактики ОРВИ путем назначения терапевтического средства эффективное количество по крайней мере одного противовирусного соединения из их числа описанный в патентах США и опубликованный международный патент применения перечисленные в Таблице 1 и Таблице 2 дыханияем. Одновременно при осуществлении способа противовирусное соединение представляет собой небольшую молекулу. В другом варианте применения противовирусного соединения является ингибитор протеазы. В а дальнейшее воплощение, противовирусный ингибитор протеазы является ЗС-подобный ингибитор протеазы и / или папаиноподобный ингибитор протеазы. В другом вариант осуществления противовирусное соединение является ингибитором РНК зависимой РНК-полимеразы. В другом варианте осуществления, первая противовирусная смесь которая является ли ингибитор протеазы вводимым со вторым противовирусным соединением который является РНК-зависимым ингибитором РНК-полимеразы. Изобретение далее предусматривает введение стероидного противовоспалительного препарата в комбинация по меньшей мере с одним противовирусным соединением, например, из противовирусные соединения, описанные в документах,

перечисленных в Таблице 1 и Таблица 2 при вдыхании. Стероидальное противовирусное лекарственное средство может быть введено ингаляционно для местного эффекта или введено в течение внутрирастворительной абсорбции как через устный или внутривенный маршрут.

[0027] изобретение дополнительно предусматривает применение противовирусного соединения, как определено выше, при изготовлении лекарственного средства для лечения тяжелый острый респираторный синдром.

[0028] изобретение дополнительно предусматривает комплект для использования потребителем в целях: лечение и / или профилактика ОРВИ. Такой комплект включает: а) фармацевтическая композиция, содержащая терапевтически эффективное количество по крайней мере одного противовирусного соединения из числа описанных в США патенты и опубликованные международные патентные заявки, перечисленные в Таблице 1 а также Таблица 2 и фармацевтически приемлемый носитель, транспортное средство или разбавитель; (b) контейнер для хранения фармацевтической композиции; и, необязательно; (c) инструкции, описывающие метод использования - фармацевтические композиции для лечения и / или профилактики АТИПИЧНАЯ ПНЕВМОНИЯ. Набор может дополнительно содержать множество противовирусных соединений для лечения ОРВИ, где выбраны противовирусные соединения из ЗС-подобных ингибиторов протеазы и папаиноподобных ингибиторов протеазы. В более дальний вариант осуществления, набор содержит противовирусную смесь которая РНК-зависимый ингибитор РНК-полимеразы. Когда комплект содержит более чем одно противовирусное соединение, противовирусные соединения, содержащиеся в комплекте может быть необязательно комбинированным в одной и той же фармацевтической композиции.

[0029] дополнительный аспект изобретения предусматривает использование At по крайней мере одно из противовирусных соединений, описанных в патентах США и опубликованные международные патентные заявки, перечисленные в Таблице 1 и Таблица 2 для изготовления лекарственного средства для лечения или профилактики АТИПИЧНАЯ ПНЕВМОНИЯ.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

[0030] илл. 1: Схема организации генома коронавируса.

[0031] илл. 2: Схема продуктов генов коронавируса ORF1a/ORF1b.

[0032] илл. 3 (A-C): выравнивание последовательностей полинуклеотидов коронавируса для выбранные гены (включая нуклеокапсид (N), матрицу (M) и гемаглуттинин-эстераза (он)).

[0033] рис. 4 (A-F): выравнивание полипептидных последовательностей коронавируса (включая ORF1a / ORF1b, нуклеокапсид (NP), гемаглуттинин-эстеразу (HE), огибающая (Sm или E), матрица (M) и шип (s)).

[0034] рис. 5: выравнивание последовательностей полипептида шипа (с), принятых от ИНЖИР. 4, в области пересечения областей S1 и S2, и место расщепления протеазы для отдельных коронавирусов.

[0035] рис. 6: CDC филогенетическое дерево штамма SARS-CoV (Clustalx 1.82, сосед-присоединяющееся дерево).

[0036] рис. 6A показывает анализ протеина коронавируса N,

[0037] илл. 6B показывает анализ протеина коронавируса S, и

[0038] рис. 6C показывает анализ протеина коронавируса M.

[0039] рис. 7: сохраненная и специфическая последовательность вируса SARS.

[0040] фиг. 7A-7D показывают множественные выравнивания последовательности (CLUSTAL W 1.82) из структурные белки генома вируса ОРВИ (7A: Реп4 Spike protein; 7B: протеин мембраны РЕР7 малый; 7C: гликопротеин матрицы РЕР8; 7D: РЕР13 нуклеокапсидный белок), которые имеют аналоги во всех или некоторых из другие известные коронавирусы.

[0041] фиг. 7E-7H показывают дендрограммы сообщая расстояния протеина среди последовательности в линиях 7A-7D. метки 229E: коронавирус человека; МЭВ: вирус гепатита мышей; TGV: вирус трансмиссивного гастроэнтерита; AIBV: вирус инфекционного бронхита птиц; KPC: коронавирус крупного рогатого скота; ПЕДВ: свиной эпидемический вирус диареи.

[0042] илл. 8: выравнивание 5'УТР нескольких коронавирусов, чтобы показать консенсусная нуклеотидная последовательность в 5'УТР.

[0043] рис. 9: последовательности предпочитаемых праймеров для амплификации 5'УТР. F и R обозначают прямые и обратные праймеры ПЦР, а также числа укажите положения нуклеотидов в пределах фиг. 8.

[0044] илл. 10: выравнивание 3'УТРЫ нескольких коронавирусов, чтобы показать консенсусная нуклеотидная последовательность в 3'УТР.

[0045] рис. 11: последовательности предпочтительных праймеров для усиления сигнала 3'УТР. F и R обозначают прямые и обратные праймеры ПЦР, а также числа укажите положения нуклеотидов внутри фиг. 10.

[0046] илл. 12: прогнозирование спиральн-катушки для SEQ ID нет: 6042, используя катушки программа (рис. 12A) или LeatCoil (рис. 12B).

[0047] илл. 13: пример вставки репортерного гена, представляющего интерес при а сайт между существующими генами вируса ОРВИ. Малый неструктурный ген изделия не изображены схематично.

[0048] илл. 14: схема, изображающая репрезентативные примеры вируса SARS репликонов. Мелкие неструктурные генопродукты не изображены схематически.

[0049] илл. 15: протеиназа вируса SARS nsp2 (3CLp) и идентификация каталитические и субстратные участки.

[0050] илл. 16: выравнивание протеиназы вируса атипичной пневмонии nsp2 (3CLp) с этим о птичьих IBV, MHV и ВСoV. Остатки в пунктирных полях являются ключевыми остатками участки подложки (F, Y & H); остатки в твердых коробках являются каталитическими остатками цистеина (C) и гистидина (H).

[0051] рис. 17: организация генома коронавируса SARS. Репликаза и показаны структурные области, а также прогнозируемые продукты расщепление внутри ORF1a и ORF1b. положение лидера 5' РНК последовательность (L), 3' Поли(а) тракт и рибосомальный фрейм-сдвиг консенсус между ORF1a и ORF1b также указывается. Каждая коробка представляет собой белковый продукт. Они затеняются в зависимости от уровня аминокислоты идентичность с соответствующими белками других коронавирусов (см. Также Таблица 2). Специфичные для SARS гены-белые. Позиции из 9-ти Специфичные для SARS шестибазальные последовательности IG (5'-ACGAAC-3'; SEQ ID NO 7293) являются обозначается стрелками.

[0052] рис. 18: геномная организация коронавирусов представитель группа 1 (HCoV-229E, регистрационный номер: AF304460), группа 2 (мышинный гепатит вирус MHV, вступительный номер: NC.SUB.--001846), группа 3 (Птичья инфекция вирус бронхита AIBV, регистрационный номер: NC.SUB.-001451) и тора коронавируса. Другие полностью секвенированные коронавирусы, используемые в этом исследовании доступны по следующим

регистрационным номерам: эпидемия свиней вирус диареи (PEDV), AF353511; вирус трансмиссивного гастроэнтерита (TGV), ND.SUB.--002306; бичий коронавирус (BCoV): AF220295. Красная коробка представляют собой группоспецифичные гены. Положение последовательности РНК-лидера и Поли(а) тракт также показан в геномах, где они сообщаются. Положение специфических последовательностей IG показано кругами разные оттенки. В геноме SARS мы также находим три последовательности IG специфичен для коронавируса группы 2.

[0053] рис. 19: топологическая модель, предсказанная для спайкового белка прикрепленный к вирусной мембране. Структурный и прогнозируемый функционал Домены указаны. Предполагается, что N-терминальная область (S1) будет содержать рецептор связывающий домен. 2 зоны спиральной катушки внутри С2 домен, частично накладывающийся на лейциновые мотивы молнии, предположительно являются участвует в олигомеризации. Гидрофобный домен отвечает за: ставить на якорь мембраны.

[0054] рис. 20: филогенетическое дерево, полученное из множественной последовательности выравнивание 922 bp внутренней области гена pol от 12 коронавирусы и ОРВИ. Числа в узлах представляют собой результат а bootstrap анализ и сильно поддерживает ветви. Последовательностей нет доступные в пределах полных геномов коронавируса были восстановлены от Генбанка по следующим присоединительным номерам: гемагглютинирующий вирус энцефаломиелита свиней (PHEV), AF124988, вирус ОК43 человека (OC43), AF124989, собачий коронавирус (CCV), AF124986, кошачий инфекционный вирус перитонита (FIPV), AF124987, Турция коронавируса (TCV), AF124991, вирус сиалоакриоаденита крыс (сдав), AF124990.

[0055] илл. 21: 21а. Некорневое дерево, полученное в результате выравнивания консенсусные последовательности группы I и группы II S1 домен Спайка протеины (G1_cons и G2_cons) с тем из шипа группы 3 (AIBV) и всплеск вируса ОРВИ. Это число указывает на результат начальной загрузки анализ. Последовательности, используемые для формирования профиля консенсуса из группы 1 являются: HCoV-229E, присоединительный номер P15423; свиньи эпидемические диареи вирус (PEDV), acc no: NP.SUB.--598310; трансмиссивный гастроэнтерит вирус (TGV), acc no: NP.SUB.--058424; собачий коронавирус (CCV), acc нет: S41453; свиной респираторный вирус (PRV), acc no: S24284; кошачий инфекционный вирус перитонита (FIPV), acc no: VGIN79. Используемые последовательности для формирования профиля консенсуса из группы 2 являются: вирус гепатита мыши (MHV), acc no: NP.SUB.--045300; Bovine coronavirus (BCoV), acc no: NP.SUB.--150077; коронавирус человека OC43, acc no: P36334; гемагглютинирующий вирус энцефаломиелита свиней (PHEV), acc no: AAL80031; для группы 3, только последовательность спайкового белка птичьего инфекционного бронхита вирус (AIBV), acc no: aao34396 был использован. 21B: схематическое представление положения цистеина в доменах S1 группы 1, 2 и 3, сравненные к Спайк от ОРВИ. Горизонтальные полосы представляют последовательности аминокислоты S1 (в случай SARS и AIBV) или консенсусные профили (полученные из группы 1, G1_cons, а из группы 2, G2_cons). Длина адвокатских сословий нет к масштаб. Относительные положения цистеина обозначены прямоугольными полосами. Только сообщается, что цистеины прекрасно сохраняются в каждом консенсусе. Линии соедините сохраненные цистины между доменом SARS S1 и консенсусом последовательности, как показано.

[0056] илл. 22: иллюстрация белка Neisseria Adhesin A (NadA).

[0057] рис. 23: сырой перевод из генома коронавируса SARS (чтение рамка +1).

[0058] рис. 24: сырой перевод из генома коронавируса SARS (чтение рамка +3)

[0059] рис. 25: 1b и Спайк открывают рамки для чтения, разделенные *.

[0060] илл. 26: атипичный рост в клетках vero.

[0061] илл. 27: хроматограмма стадии захвата коронавируса SARS на Суперформанс Сульфата Целлюлозы Матрицы 150/10. Анализ был на 100 мл урожай короновируса. Левая ось Y показывает поглощение при 280 Нм. То правая ось Y показывает градиент (% V). Ось X показывает объем (мл).

[0062] рис. 28: Серебр-заяптаннные части хроматографии MCS. Переулки есть: (1) маркер; (2) урожай клеток vero коронавируса; (3) клетка vero коронавируса урожай, после фильтрации 0.65. μm ; (4) пропускание потока; (5) мыть; (6) 20% пик (вирусный пик). Дорожки были загружены 1. μg тестового белка.

[0063] рис. 29: Западное пятно фракций хроматографии MCS. Переулки есть как описано на фиг. 28.

[0064] илл. 30: ультрацентрифугирование линейного градиента плотности, 15-60% сахара (SW28, 2 часа, 20000 об / мин). На графике показана концентрация белка (.коробка-сплошная.) и концентрация сахарозы (.Алмаз-твердый.).

[0065] рис. 31: окрашенные серебром фракции градиента плотности на NuPage 4-12% Bis-Tris-Ge (Novex), пониженные условия, нагревается в течение 10 минут при 70.степень. С. Майны являются следующими: (1) отметка; (2) пиковый MCS 20%; (3) плотность фракция градиента 11; (4) фракция градиента плотности 12; (5) плотность градиентная фракция 13; (6) градиентная фракция 14 плотности; (7) Плотность фракция градиента 15; (8) фракция градиента плотности 16; (9) плотность градиентная фракция 17. Основная масса белков была во фракциях 15-17. Полосы 2, 8 и 9 были загружены белком 1. μg .

[0066] илл. 32: Хроматограмма стадии захвата коронавируса SARS на МКС. Детали такие же, как и на фиг. 27, за исключением того, что было использовано 200 мл урожая.

[0067] илл. 33: Silverstain (слева) и Western Blot (справа) of хроматографические фракции. Полосы движения такие же, как и на фиг. 28 и 29 лет, за исключением того, что полоса (6) - это 5% пик. Лечение перед СДС-Пейдж проходило по адресу температура в помещении в течение 30 минут.

[0068] илл. 34: ультрацентрифугирование градиента плотности, сахароза 15-40% (SW28, 2 часа, 20000 об / мин). На графике показана концентрация белка (.коробка-сплошная.) и концентрация сахарозы (.Алмаз-твердый.).

[0069] рис. 35: Silverstain (слева) и Western Blot (справа) плотности Градиентные фракции Ультрацентрифугирования на NuPage 4-12% Bis-Tris-Ge (Novex), сокращенные условия. Полосы движения: (1) маркер; (2) градиент плотности фракция 6; (3) градиент плотности фракция 7; (4) градиент плотности фракция 8; (5) градиент плотности фракция 9; (6) градиент плотности фракция 10; (7) градиент плотности фракция 15. Фракции 7-10 (полосы 3-6) содержит чистые белки коронавируса. Основная масса примесей находилась в фракция 15 (пер. 7). Полосы 2, 8 и 9 были загружены .о нас.1. μg белок. Обработка перед СДС-страницей проводилась при комнатной температуре в течение 30 минут минут.

[0070] илл. 36: ЭМ-изображения фракций градиента плотности 8-10. ИНЖИР. 36А показывает фракцию 8; фиг. На рис. 36Б показана часть 9; фиг. 36С показывает фракцию 10.

[0071] рис. 37: Spike / nada fusion constructs.

[0072] фиг. 38 и 39: результаты экспрессии в E. coli S1.SUB.Л, S1.SUB.Л-Нада и S1.SUB.Л-Нада.SUB..ДЕЛЬТА.якорь.

[0073] илл. 38 показывает анализ SDS-страницы полных лизатов от BL21 (DE3)/pET, BL21(DE3) / pET-S1.SUB.L и BL21 (DE3) / pET-S1.SUB.Л-Нада.SUB..ДЕЛЬТА.якорь. Эти полосы обозначаются символом: стрелка, и три полосы движения, слева направо: BL21 (DE3) / pET; BL21 (DE3) / pET-S1.SUB.L; BL21 (DE3) / pET-S1.SUB.Л-Нада.SUB..ДЕЛЬТА.якорь.

[0074] рис. 39 показывает (39А) SDS-PAGE и (39В) western blot анализы всего лизатов из BL21 (DE3)/pET, BL21(DE3) / pET-S1.SUB.Л-нада (выращенная под неиндуцированным состоянием) и BL21 (DE3) / pET-S1.SUB.Л-нада (выращивается под индуцированное состояние). Полосы обозначаются стрелкой, а полосы движения являются, слева направо: BL21 (DE3)/pET; BL21(DE3) / pET-S1.SUB.Л-Нада; BL21 (DE3) / pET-S1.SUB.Л-Нада. Западное пятно указывает на наличие олигомерные формы белка.

[0075] рис. 40: схема клонов шипов SARS.

[0076] илл. 41: транзиторная экспрессия Спайковых белков SARS (western blot лизата клеток COS7). Каждая Майна геля 4-20% TG SDS была нагружена с 20.мг. g лизат клеток (всего 1,2 мг). Показаны маркирующие антитела.

[0077] рис. 42: анализ Western blot лизатов клеток COS7 на 4% TG SDS гель, показывающий состояние олигомеризации внутриклеточных молекул S.

[0078] илл. 43: Western blot анализы лизатов клеток COS7 на 4-20% TG SDS гель, показывающий преходящую экспрессию Спайковых белков SARS. Переулки есть: (1) MOK, AF; (2) MOK, DF; (3) nSh, AF; (4) nSh, DF; (5) nSh.DELTA.TC, AF; (6) nSh.DELTA.TC-ДФ. Каждая полоса была загружена с 5.мг. 1 каждого образец, 400. мг. всего. Клякса была помечена антителом против вируса. Его-Меченый белок.

[0079] рис. 44: анализ Western blot клеточной среды COS7 на 4-20% TG SDS гель, обладающий транзиторной экспрессией Спайковых белков SARS. Усеченный шип белок секретируется. Спайковые белки были очищены от культуральной среды (от плиты 10 см), сперва колонкой CopA и после этого окончательно Histag Магнитные шарики. Каждая полоса была загружена одной третью материала.

[0080] илл. 45: Western blot анализы лизатов клеток COS7 на 4-20% TG Гель SDS, показывающий гликозилирование спайковых белков SARS. В двух левых руках кляксы (полосы 1-5), образцы кипятили в SDS И.бета.- меркаптоэтанол; в двух правосторонних кляксах (полосы 6-11) образцы находились только в SDS, причем никакого кипячения. Полосы 1-8 были помечены моноклонально поднятым против Протеин His-tag; lables 9-11 были обозначены с антителом анти -- SARS кролика.

[0081] рис. 46: влияние экспрессии спайкового белка SARS на клетку жизнеспособность.

[0082] илл. 47: анализ Western blot лизатов клеток COS7 на 4% TG SDS гели, показывающие состояние олигомеризации внутриклеточных спайковых молекул. Кляксы были помечены анти-his-tag mAb. Мембранная фракция COS7 клеточный лизат фракционировали с помощью калибровочной колонки перед загрузкой полос движения. Фракции от 7 до 14 показывают полосы со значениями КДА: 71000, 1400, 898, 572, 365, 232, 148 и 99 соответственно.

[0083] рис. 48: фракционирование клеток на водные и моющие средства десятые доли.

[0084] илл. 49: схема конструкций для использования в подготовке OMV.

[0085] рис. 50: конструкции SARS HR1 и HR2.

[0086] илл. 51: Вакцинная защита от ОРВИ в модели мыши Balb / C.

[0087] илл. 52: экспрессируется на Спайковом белке в трансфицированной 293 клетке лизаты (52A) или супернатанты культуры клеток COS7 (52B). Белки были выделяют по 4-20% гелей TG SDS. Ярлык был анти -- его-биркой, за исключением справа три полосы движения по 52B, где была надпись rabbit anti-SARS сыворотка.

[0088] на фиг. 52A, левосторонние три полосы движения были обработаны DTT и были сварены, но ни одна обработка не была использована для правой тройки переулки. на рисунке. 52B, никакой DTT не было использовано, но все майны были нагреты к 80.степень. С. На 5 минут.

[0089] рис. 53: Западное пятно спайковых белков, экспрессируемых в клетках COS7. Белки инкубировали при комнатной температуре (PT), 80.степень. С. или 100.степень. С. проверить для любого влияния на молекулярном весе. ИНЖИР. 54 шоу аналогичные эксперименты проводились и на ВИРИОНАХ SARS.

[0090] илл. 55: результаты эксперимента Pulse chase, показывающие выражение и обрабатывать протеина шипа SARS следовать инфекцией с alphavirus частицы-репликоны. Клетки были обработаны С или без EndoH как показано.

[0091] илл. 56: влияние нагрева на тримеры спайкового белка.

[0092] рис. 57: Coomassie синий окрашенный гель дрожжей выраженных белков. Полосы движения: 1-см. Blue Standard (10. мг. l); 2-pAB24 gbl (20 .мг.g); 3-SARS Спайк S1 с. 1 gbl (20. мг. g); 4-Спайк S1 C.2 gbl SARS (20 .мг.g); 5-см. Синий Стандарт (10 .мг.l); 6-pab24 ip (5 .мг.l); 7-SARS Spike S1 с. 1 (5 .мг. l); 8-Спайк S1 C.2 SARS (5 .мг.l).

[0093] фиг. 58-64: схемы приготовления дрожжей экспрессии соорудит.

[0094] фиг. От 65 до 66: дрожжи-выраженные последовательности для Спайка.

[0095] FIG. 67: западные кляксы, показывающие экспрессию спайкового белка SARS из частиц репликации альфавируса и РНК репликации.

[0096] илл. 67A было запущено в условиях поп-уменьшения и на комнате температура (т. е. отсутствие топления), с майнами: (1) инфекция VEE/SIN-шипа; (2) инфекция VEE/SIN-GFP; (3) трансфекция РНК Replicon-spike; (4) Трансфекция РНК Replicon-GFP.

[0097] илл. 67B было побежано с вирионами SARS на различных температурах, как показанный.

[0098] илл. 68: индукция реакции антитела в мышах. Группы вакцин являются: (1) инактивированный вирус ОРВИ; (2) усеченный рекомбинантный спайковый белок; (3) полнометражный шип: ДНК+ДНК.ПЛГ+ Альфавирус; (4) полнометражный шип: Только частицы альфавируса.

[0099] илл. 69: связывание человеческого моноклонального антитела S3. 2 с очищенным усеченный спайковый белок. По оси X показана концентрация антител, а по оси ординат- Ось Y показывает поглощение ELISA. Результат интерполяции-2158.13.

[0100] илл. 70: среднее геометрическое значение титров ИФА антител, индуцированных Спайковый белок SARS-CoV поставляется в виде различных вакцин (слева направо: инактивированный вирус; 3. MU. g усеченный спайковый белок; 75. MU. G кодирование ДНК усеченный спайковый белок.

[0101] илл. 71: титры нейтрализации после иммунизации с помощью (слева) nSd.DELTA.TC кодирование белка или (справа) ДНК nSd.DELTA.TC, поставленный дальше ПЛГ.

[0102] илл. 72: корреляция между связыванием спайкового антигена и нейтрализующие антитела

[0103] илл. 73: Западное пятно клеточных линий CHO, экспрессирующих спайковый белок в полнометражном виде (слева) или в усеченном виде (справа). Белки были отделенный 4-12% SDS-страниц, с кипеть в DTT и пятнать мимо поликлональная сыворотка.

[0104] илл. 74: структурные компоненты спайкового гликопротеина SARS-CoV и конструкция выражения. L обозначает лидирующий пептид (остатки 1-13), TM - трансмембранные, а также Су цитоплазматические хвостовые сегменты. The hexa-его метки не показываются.

[0105] рис. 75: анализ Western blot спайковых белков SARS, выраженных в Клетки COS7.

[0106] на фиг. Клетки 75A, COS7 были трансфицированы с указанной плазмидой конструкты и экспрессируемые белки в клеточных лизатах 48 ч пост-трансфекция была проанализирована с помощью SDS-страницы (4-20% полиакриламид) в редуцирующие и денатурирующие кондиции, при этом белки визуализируются с помощью анти-гистидин Mab.

[0107] на фиг. 75B, белки были собраны из клеточной культуральной среды 48 пост-трансфекция XP и очищенный сперва столбцом Кона и после этого мимо Его-тег магнитные бусины. Очищенные белки анализировали методом SDS-PAGE (4-20% полиакриламид) и визуализировались с помощью анти-ОРВИ кроличьей сыворотки.

[0108] рис. 76: чувствительность Endo H усеченного протеина шипа с-стержня (S. DELTA.) найденный в лизате клетки (майнах 1,2) и питательной среде (майнах 3,4). Позиции внутреннего S. DELTA. белок и секретируемый S. DELTA. белки помечены головками стрелок.

[0109] илл. 77: Олигомерное состояние спайкового белка SARS. Рекombинантный Олигомер белка S в клетках COS7, трансфицированных полноразмерным Спайком конструкт (nSh). Лизаты клетки были обработаны с DTT / или жарой как указано над каждой полосой движения. Различные формы протеина S в обработанном а необработанные образцы визуализировали с помощью SDS-PAGE (4% полиакриламид) и Вестерн Блот анализ с использованием анти-гистидина Mab.

[0110] илл. 78: влияние тепловой денатурации на олигомерное состояние воды рекомбинантный белок S при отсутствии DTT. Лизаты клетки COS7 были нагретый перед электрофорезом как показано и протеины С были визуализируется так же, как описанный фоги фиг. 77.

[0111] илл. 79: влияние тепловой денатурации на олигомерное состояние спайковый белок в частицах вириона SARS. Торс-ков выращивали в Веро клетки, очищенные и солюбилизованные из частиц вириона SDS, жар-денатурированный как показано и визуализировано как описано в FIG. 77, за исключением того, что антисыворотка кролика против очищенного вируса была использована как а зонд.

[0112] илл. 80: анализ олигомерного статуса Спайка вириона торс белок путем кросслинkinгового эксперимента. Солюбилизованные вирионные белки SARS лечились с помощью ДМС. Как необработанный (-), так и обработанный ДМС (+) Вирион белки подвергались тепловой денатурации в отсутствие DTT и визуализировались по 4% За страницей следовали серебряные пятна.

[0113] фиг. 81 и 82: анализ олигомерного статуса усеченного вещества спайковый белок путем тепловой денатурации. Усеченный спайковый белок внутри COS7 клеточные лизаты (81) или секретируемые в культуральную среду (82) нагревались денатурировано как показано в отсутствие DTT и визуализировано западным анализ пятен.

[0114] илл. 83: реакционная способность дегликозилированного полноразмерного спайкового олигомера с конформационным и неконформационным антителом. Во всю длину рекомбинантный спайковый олигомер был частично дегликозилирован с PNGase F in неденатурирующее состояние и визуализируется методом Western blot analysis с использованием антигистидиновая мазь (Лейн 1,2,3) или антисыворотка кролика против очищенного ОРВИ Ков (пер. 4,5,6).

[0115] илл. 84: локализация выраженных спайковых белков SARS в фракционированный лизат клеток COS7 визуализируется с помощью western blot. Клетки были трансфицированы с указанными плазмидами и лизированный гомогенизатором Dounce в гипотонический буфер 48 ч после трансфекции. Клеточный лизат центрифугировали до получить растворимый цитозоль и нерастворимую фракцию мембраны, которая была дополнительно растворим в 4% Тритоне x-100. Белки нагревали с SDS при 80 ° C и проанализировано SDS-страницей (полиакриламидом 4-20%) в уменьшая состоянии. Белки визуализировали с помощью антигистидинового Mab. Цитозольные фракции были загружены в полосах 1, 3 и 5 и мембранные фракции были загружены в полосах 2, 4 и 6.

[0116] илл. 85: внутриклеточное и поверхностное выражение рекомбинантного полноразмерный (A,D) или усеченный (B,E) спайковый белок в клетках COS7. То клетки были зафиксированы на 48 часах посттрансфекции и или обработаны с детергент (Cytofix/perme, BD Biosciences) для внутриклеточного применения иммунофлуоресценция (A,B,C) или с 2% параформальдегидом для поверхности клетки наблюдение иммунофлуоресценции (D,E,F) at .раз.40 увеличение. Издеваться трансфецированные клетки (с,F) были включены в качестве контроля.

[0117] фиг. 86-105: SDS-страница od E. coli выраженные белки. Тот=всего белок; золь=растворимая фракция белка. Метки - это названия белков (таблицы 26-30).

[0118] илл. 106: иммунофлюоресценция после введения вектора кодирование оптимизированного N антигена.

[0119] илл. 107: Иммунофлуоресценция (а) нативного и (Б) кодон-оптимизированного кода М последовательностей.

[0120] илл. 108: Иммунофлуоресценция а) нативного и В) оптимизированного кодона Е последовательности.

[0121] фиг. 109-111: западные кляксы клеток Vero с использованием кроличьих антител полученные после иммунизации спайковыми белками экспрессируются в кишечной палочке.

[0122] рис. 112: экспрессия спайкового белка в 293 клетках. Полосы Движения: (М) Маркеры; (1) Mock transfected; (2,6) клетки, экспрессирующие белок nS, лизат; (3,7) клетки, экспрессирующие белок nSdTC, лизат; (4,8) клетки, экспрессирующие nS белок, супернатант; (5,9) (4) клетки, экспрессирующие белок nSdTC, надосадочная жидкость. Окрашивающее антитело: (2-5) сыворотка мыши, полученная после ДНК иммунизация; (6 до 9) сыворотка кролика полученная после иммунизации с целый убитый вирус.

[0123] илл. 113: шесть рамок для чтения SEQ ID NO: 9968.

[0124] FIG. 114: шесть рамок для чтения SEQ ID NO: 10033.

[0125] илл. 115: выравнивание коронавируса крупного рогатого скота pol 1ab (верхний ряд; SEQ ID NO: 10068), птичий инфекционный бронхит pol 1ab (второй ряд; SEQ ID нет: 10069), вирус гепатита мышей pol 1ab (третья строка; SEQ ID NO: 10070), SEQ ID HE.T.отхлебывать.S: 9997/9998 (четвертый ряд) и последовательность консенсуса (нижний ряд; SEQ ID NO: 10071).

[0126] илл. 116: схема организации генома коронавируса.

[0127] илл. 117: схема продуктов генов коронавируса ORF1a / ORF1b, включая регион"*".

[0128] FIG. 118: выравнивание.

[0129] илл. 119: альтернативные стартовые кодоны в пределах SEQ ID NO: 10080.

[0130] илл. 120: шесть рамок для чтения SEQ ID NO: 10084.

[0131] илл. 121: выравнивание SEQ ID NO: 10033 и SEQ ID NO: 10084.

[0132] FIG. 122: рамки для чтения в SEQ ID нет: 10084.

[0133] илл. 123: начните анализ кодона для SEQ ID NO: 10084.

[0134] илл. 124: взрывной анализ SEQ ID NO: 10210.

[0135] рис. 125: Эпитопный анализ SEQ ID NO: 10210 либо (13A) Hopp & Woods или (13B) Kyte & Doolittle.

[0136] илл. 126: рамки для чтения в SEQ ID NO: 10299.

[0137] илл. 127: рамки для чтения в SEQ ID NO: 10505.

[0138] рис. 128: рамки для чтения в SEQ ID NO: 11563.

[0139] илл. 129: рамки для чтения в SEQ ID нет: 10033.

[0140] илл. 130: выравнивание SEQ ID NO: 9997 и SEQ ID NO: 10033.

[0141] илл. 131: рамки для чтения в SEQ ID NO: 10299.

[0142] FIG. 132: рамки для чтения в SEQ ID NO: 10505.

[0143] илл. 133: Западное пятно фракций очистки протеазы SARS.

[0144] илл. 134: расщепление ДАБЦИЛ-ЭДАНОВ (флуоресцентно меченый пептид с местом расщепления протеазы SARS) протеазой SARS на различной концентрации загрязнителей. На графике показаны корреляции активности / концентрации с отсутствием протеазы (.Алмаз-твердый.), 0,95 мкм протеаза (.коробка-сплошная.) и 2.86 мМ протеаза (.круг-сплошной.).

[0145] в случае расхождения между последовательностью в последовательности: перечисление и последовательность в чертежах, чертежи должны принять старшинство.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0146] практика настоящего изобретения будет применяться, если только в противном случае указываются общепринятые методы химии, биохимии, молекулярная биология, иммунология и фармакология, в пределах искусства Рисунки. Такие приемы подробно описаны в литературе. См., например, Фармацевтические науки Ремингтона, издательство Мак, Истон, Па., 19-е издание (1995); методы в энзимологии (S. Colowick and N. Kaplan, eds., Academic Press, Inc.); и руководство по экспериментальной Иммунология, Т. I-IV (D. M. Weir and C. C. Blackwell, eds., 1986, Blackwell Scientific Publications); Sambrook, et al., молекулярное клонирование: Лабораторное руководство (2-е издание, 1989 г.); Справочник по поверхности и Коллоидная химия (Birdi, K. S. ed., CRC Press, 1997); короткие протоколы в области молекулярной биологии, 4-е изд. (Ausubel et al. ЭЦП., 1999, John Wiley & Сыновья); Методы Молекулярной Биологии: Интенсивный Лабораторный Курс, (Ream et al., ЭЦП., 1998, академическая пресса); ПЦР (введение в Biotechniques Series), 2-е изд. (Newton & Graham eds., 1997, Springer Verlag); Peters and Dalrymple, Fields Virology (2d ed), Fields et al. (ЭЦП.), B. N. Raven Press, New York, NY.

[0147] Все публикации, патенты и патентные заявки, приведенные в настоящем документе, настоящим они включаются по ссылке в свои права собственности.

[0148] недавно был обнаружен вирус тяжелого острого респираторного синдрома (торс). идентифицирован как новый вирусный вид. К вирусным видам ОРВИ относятся: вслед за изолятами. [0149] два изолята вируса, описанные в Peiris et al. "Коронавирус как возможная причина тяжелого острого респираторного заболевания синдром " Ланцет опубликовано на сайте <http://image.thelancet.com/extras/03art3477web.pdf> на апрель. 8 2003, включены здесь по ссылке в полном объеме и последовательности депонируется в Генбанке под регистрационным номером AY268070. [0150] изоляты и вирусные последовательности, описанные в работе Drosten et al., "Идентификация о новом коронавирусе у пациентов с тяжелым острым респираторным заболеванием Синдром", New England Journal of Medicine, опубликовано на сайте: <http://www.nejm.org> на апрель. 10, 2003. [0151] The isolates and viral последовательности, описанные на веб-сайте сети ВОЗ в марте. 25 и 24 лет, 2003. [0152] изоляты и вирусные последовательности, описанные в Tsang et al., "Скопление случаев тяжелого острого респираторного синдрома в Гонконге Kong " New England Journal of Medicine, опубликовано на сайте <http://www.nejm.org> на Мар. 31, 2003. [0153] The isolates and viral последовательности, описанные в Poutanen et al., "Выявление тяжелых острых заболеваний Респираторный синдром в Канаде " медицинский журнал Новой Англии, опубликовано на сайте: <http://www.nejm.org> на Мар. 31, 2003. Как описано выше в статье Ланцета, 646 пар оснований полинуклеотид от вируса SARS имеет слабую гомологию к вирусам семейства *Coronaviridae*. ланцет статья далее сообщает, что выведенная последовательность аминокислот (из 215 аминокислоты) из этой последовательности имеет около 57% гомологии последовательности к РНК полимеразы коронавируса крупного рогатого скота и вируса гепатита мышей. Филогенетический анализ белковых последовательностей также представлен в Ланцете статья, показывающая, что последовательность полимеразы наиболее тесно связана с коронавирусом II группы.

[0154] дополнительные вирусные изоляты торс могут быть идентифицированы, выделены и/или секвенированные вирусологами, искусными в этом искусстве. Вирусологи могут легко идентифицировать новые вирусные изоляты как вирус атипичной пневмонии. Критерии, по которым работает вирусолог может использоваться для идентификации новых изолятов атипичной пневмонии включают: последовательность гомологии новый изолят к известным вирусным изолятам SARS; подобная геномная организация новый вирусный изолят к известным вирусным изолятам ОРВИ; иммунологический (серологическое) сходство или идентичность с известными вирусными изолятами торс; патология; и сходство морфологии вирионов с известными вирусными ОРВИ изоляты; и сходство морфологии инфицированных клеток, как это вызвано известные вирусные изоляты SARS (визуализируемые, например, электроном микроскопия).

[0155] методы выделения и секвенирования вирусных изолятов торс включают: методы, описанные Peiris et al. в газете "Ланцет". Как сообщалось ранее в статье Lancet РНК из клинических образцов может быть обратно транскрибирована с помощью случайных гексамеров и кднк может быть усилена с помощью праймеров, имеющих последовательности SEQ ID NOS: 6584 & 6585 в присутствии 2,5 ммоль/л хлорид магния (94.степень. С. На 1 минута, 50.степень. С. В течение 1 минуты, и 72.степень. С. На 1 минута).

[0156] обратная транскрипция вирусного изолята с использованием случайных гексамеров может быть выполнено в анализе РТ-ПЦР следующим образом. Вирусные изоляты являются размножаются на клетках млекопитающих, в частности на клетках почек плода-резуса. Общая РНК из вирусно-инфицированной и вирусно-неинфицированной почки резуса плода клетки после этого изолированы. Образцы РНК реверсно транскрибируются с помощью праймера имея SEQ ID NO: 6586. кднк может быть усилена праймером, имеющим SEQ ID Нет: 6587. Уникальные продукты ПЦР (по размеру) в препарате зараженной клетки затем клонируются и секвенируются, а также генетические гомологии последовательности по сравнению с теми, что в Генбанке.

[0157] один специалист в этой области будет в состоянии идентифицировать и клонировать дополнительные геномные области с использованием различных стандартных методов клонирования методы, такие как, например, использование случайного праймера RT-PCR и обнаружение последовательностей, перекрывающих одну или несколько из вышеперечисленных последовательностей, и / или использование олигонуклеотидных праймеров, например дегенеративных праймеров, на основе приведенные здесь последовательности(см. 1-5, фиг. 8-11, SEQ ID NOS: 3-20).

[0158] клонирование, секвенирование и идентификация вируса торс одним человеком квалифицированные в этой области искусства могут быть

дополнительно облегчены с помощью использования полинуклеотидные последовательности, в частности РНК-полимеразные последовательности, из родственные коронавирусы.

[0159] Гомология последовательностей новых вирусных изолятов с известными ОРВИ изоляты, описанные выше, могут быть легко определены одним специалистом в области Рисунок. Новые изоляты атипичной пневмонии могут быть идентифицированы по процентной гомологии вирусных нуклеотидные последовательности 99%, 95%, 92%, 90%, 85%, или гомологии 80% из новый вирус с известными последовательностями вирусных полинуклеотидов SARS. Новые изоляты ОРВИ также могут быть идентифицированы по процентным гомологиям 99%, 95%, 92%, 90%, 85%, или ... Гомология 80% полипептидов зашифрованных полинуклеотидами новый вирус и полипептиды, кодируемые известным вирусом SARS.

[0160] новые изоляты атипичной пневмонии также могут быть идентифицированы по процентной гомологии 99%, 95%, 92%, 90%, 85%, или 80% гомологии полинуклеотидной последовательности для конкретных геномных областей для нового вируса с полинуклеотидом последовательность для конкретных геномных областей известных вирусов SARS. Кроме того, новые изоляты атипичной пневмонии могут быть идентифицированы с помощью процентной гомологии из них: 99%, 95%, 92%, 90%, 85%, или гомологии 80% последовательности полипептида кодируется полинуклеотидом специфических геномных областей нового ОРВИ вирус к полипептидной последовательности, кодируемой полинуклеотидами специфические регионы известного вируса тора. Эти геномные области могут включают регионы (например, геновые продукты), которые обычно являются общими среди многочисленных коронавирусы, а также групповые специфические регионы (например, антигенные группы), такие как, например, любая из следующих геномных групп: регионы, которые могут быть легко идентифицированы вирусологом, квалифицированным в области art: 5'untranslated region (UTR), leader sequence, ORF1a, ORF1b, неструктурный белок 2 (NS2), гемагглютинин-эстеразный гликопротеин (HE) (также названный E3), гликопротеин Спайка (S) (также названный E2), ORF3a, ORF3b, ORF3x, неструктурный белок 4 (NS4), оболочка (малая мембранный белок (E) (также называемый sM), мембранный гликопротеин (M) (также названный E1), ORF5a, ORF5b, фосфопротейн нуклеокапсида (N), ORF7a, ORF7b, интергенные последовательности, 3'UTR, или РНК-зависимая РНК полимеразы (pol). Вирус SARS может иметь идентифицируемые геномные области с одним или несколькими указанными выше геномными регионами. Вирусная атипичная пневмония антиген включает в себя белок, кодируемый любым из этих геномных регионов. Один Вирусным антигеном ОРВИ может быть белок или его фрагмент, который является сильно сохраненный с коронавирусами. Вирусный антиген атипичной пневмонии может быть а белок или его фрагмент, специфичный к вирусу SARS (as по сравнению с известными коронавирусами). (Смотрите, фиг. 1-5, фиг. 8-11, SEQ ID NOS: 3-20).

[0161] одно умелое в искусстве смогло также узнать электронную микроскопию вирус атипичной пневмонии заразил клетки млекопитающих. Электронная микроскопия ОРВИ зараженные клетки показаны в ланцетной бумаге. Как обсуждается в документе, электронная микроскопия отрицательного окрашивания (3% фосфо-вольфрамат калия, рН 7.0) ультрацентрифугированные экстракты клеточных культур плода, инфицированного ОРВИ клетки почки резуса показывают наличие плеоморфного обволакиваемого вируса частицы около 80-90 Нм (диапазон 70-130 Нм) в диаметре с поверхностью морфология совместима с коронавирусом (см. ланцетную бумагу, рис. 1). Тонкослойная электронная микроскопия инфицированных клеток выявляет вирус частицы диаметром 55-90 Нм внутри гладкостенных везикул в области цитоплазма (см. ланцетную бумагу, фиг. 2B). Электронная микроскопия также может быть используется для наблюдения вирусных частиц на поверхности клеток. Электронная микроскопия образец биопсии легкого человека имеет сходную вирусную морфологию. Видеть Ланцетная бумага илл. 2A.

I. атипичные полипептиды и полинуклеотиды

[0162] изобретение относится к нуклеиновым кислотам и белкам из ОРВИ вирус. Далее приводятся примеры таких полинуклеотидов и полипептидов ниже.

[0163] в одном варианте осуществления полинуклеотиды изобретения не содержат включите один из следующих пяти праймеров, раскрытых по адресу <http://content.nejm.org/cgi/reprint/NEJMoa030781v2.pdf>: SEQ ID NOS: 6034-38.

[0164] изобретение также включает полинуклеотидные последовательности, которые могут быть используемые в качестве зондов для диагностических реагентов, наборы (содержащие такие реагенты) и методы которые можно использовать для того чтобы диагностировать или определить присутствие или отсутствие вируса ОРВИ в биологическом образце. Изобретение включает в себя: полинуклеотидная последовательность, содержащая одну или более праймерных последовательностей идентифицировано в SEQ ID NOS: 21-1020. Изобретение дополнительно включает в себя полинуклеотидная последовательность, содержащая комплемент одного или нескольких из следующих компонентов: последовательности праймеров идентифицированы в SEQ ID NOS: 21-1020.

[0165] изобретение включает полипептидную последовательность, содержащую аминокислотная последовательность из последовательности, показанной на фиг. 23. Такая аминокислота последовательности являются SEQ ID NOS: 6588-6809. Изобретение включает полипептиды содержащая аминокислотную последовательность, имеющую идентичность последовательности к ним последовательности, и изобретение включает фрагмент полипептида состоит из одной из этих последовательностей.

[0166] изобретение включает полипептид, содержащий аминокислоту последовательность из последовательности, показанной на фиг. 24. Такие аминокислотные последовательности являются SEQ ID NOS: 6810-7179. Изобретение включает белок, содержащий An аминокислотная последовательность, имеющая идентичность последовательности к этим последовательностям, и изобретение включает фрагмент белка, содержащий один из них последовательности.

[0167] изобретение включает белок, содержащий SEQ ID NO: 6039. То изобретение включает полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую идентификатор последовательности для SEQ ID NO: 6039. Изобретение включает в себя фрагмент полипептида, содержащего SEQ ID NO: 6039. Изобретение включает в себя: диагностический набор, содержащий полипептид, содержащий SEQ ID NO: 6039, или а фрагмент его. Изобретение включает диагностический набор, содержащий: полинуклеотидная последовательность, кодирующая SEQ ID NO: 6039, или ее фрагмент. Изобретение включает иммуногенную композицию, содержащую а полипептид, содержащий SEQ ID NO: 6039, или его фрагмент. То изобретение включает антитело, которое распознает полипептид, содержащий SEQ ID NO: 6039, или его фрагмент. SEQ ID NO: 6039 демонстрирует функциональная гомология с ORF1a коронавируса.

[0168] прогнозируемые трансмембранные или гидрофобные области SEQ ID NO: 6039 указаны ниже. Хотя полипротеин коронавируса есть протеолитически расщепляется на множество более мелких белков, гидрофобных домены в полипротеине известны, что посредничают ассоциацию мембраны тиражирования комплекса и иметь возможность кардинально изменить архитектура мембран клеток-хозяев. Соответственно, гидрофобные Домены полипротеина являются мишенями для генетической мутации, чтобы развиваться ослабленные Вакцины против вируса ОРВИ. Гидрофобные Домены также являются мишенями для небольших объектов молекулы ингибиторов вируса ОРВИ. Гидрофобные домены могут также быть использовано для того чтобы произвести антитела специфические к тем зонам для того чтобы обработать или предотвратить заражение вирусом SARS.

Предсказанные трансмембранные спирали в SEQ ID NO: 6039

[0169] позиции последовательности в скобках обозначают основную область.

[0170] значимыми считаются только баллы выше 500. ТАБЛИЦА-США-00001 от к центру счета Внутри и снаружи спирали: найдено 43 100 (100) 118 (116) 103 107 473 (473) 488 (488) 1003 481 529 (532) 549 (549) 541 539 584 (584) 606 (601) 1049 594 773 (773) 791 (789) 514 782 1071 (1071) 1089 (1086) 243 1078 1121 (1121) 1137 (1137) 459 1130 1679 (1679) 1696 (1696) 404 1686 2098 (2102) 2119 (2116) 509 2109 2145 (2145) 2160 (2160) 797 2153 2206 (2209) 2224 (2224) 2686 2216 2316 (2316) 2332 (2332) 2123 2325 2335 (2339) 2358 (2354) 2101 2346 2373 (2373) 2390 (2390) 532 2380 2597 (2600) 2615 (2615) 307 2607 2753 (2753) 2770 (2768) 2242 2760 2831 (2833) 2854 (2851) 759 2841 2879 (2882) 2900 (2897) 526 2889 2990 (2996) 3012 (3010) 1289 3003 3024 (3024) 3042 (3039) 2281 3032 3054 (3058) 3075 (3072) 2536 3065 3105 (3109) 3127 (3123) 2010 3116 3143 (3143) 3163 (3159) 184 3152 3253 (3255) 3272 (3272) 319 3262 3346 (3346) 3366 (3366) 203 3356 3375 (3375) 3392 (3392) 305 3384 3438 (3438) 3455 (3453) 1021 3445 3559 (3567) 3584 (3581) 1885 3574 3589 (3589) 3606 (3604) 2018 3596 3611 (3611) 3629 (3629) 2304 3621 3659 (3659) 3674 (3674) 1561 3667 3756 (3758) 3777 (3774) 2352 3767 3890 (3890) 3904 (3904) 485

3897 3916 (3919) 3934 (3934) 241 3926 4035 (4035) 4051 (4051) 335 4044 4217 (4217) 4232 (4232) 272 4224 4239 (4239) 4257 (4254) 402 4247 Снаружи
внутри спирали: найдено 43 94 (97) 118 (112) 291 104 400 (400) 418 (415) 243 407 473 (473) 488 (488) 1113 481 523 (528) 548 (548) 285 538 583 (583) 606
(601) 662 593 776 (776) 791 (791) 1435 783 1068 (1071) 1089 (1086) 370 1078 1121 (1121) 1137 (1137) 455 1130 1679 (1679) 1696 (1694) 340 1686 2098 (2098)
2119 (2116) 678 2109 2148 (2148) 2163 (2163) 434 2155 2208 (2210) 2231 (2226) 2389 2219 2309 (2309) 2332 (2326) 1773 2318 2342 (2342) 2368 (2360) 1666
2353 2373 (2373) 2390 (2390) 254 2380 2753 (2755) 2770 (2770) 2119 2763 2832 (2835) 2854 (2851) 687 2844 2858 (2858) 2873 (2873) 253 2866 2879 (2882)
2899 (2899) 400 2889 2990 (2990) 3005 (3005) 875 2998 3020 (3024) 3042 (3042) 2795 3032 3059 (3059) 3075 (3075) 2137 3067 3105 (3108) 3127 (3123) 1902
3115 3142 (3145) 3162 (3162) 540 3152 3343 (3351) 3366 (3366) 496 3358 3437 (3437) 3453 (3453) 848 3444 3489 (3491) 3508 (3505) 302 3498 3560 (3560)
3577 (3577) 1460 3569 3591 (3591) 3601 (3606) 2193 3598 3610 (3610) 3627 (3627) 1484 3620 3656 (3658) 3678 (3675) 1240 3668 3681 (3684) 3701 (3699) 590
3691 3713 (3713) 3738 (3723) 3738 (3723) 3738 (3738) 1670 3730 3760 (3760) 3777 (3775) 2367 3767 3881 (3884) 3902 (3900) 249 3892 4099 (4099)
4114 (4114) 389 4106 4234 (4234) 4254 (4249) 325 4241 4338 (4341) 4360 (4360) 505 4348

[0171] соответственно изобретение включает полипептид, содержащий а фрагмент SEQ ID NO: 6039, где указанный фрагмент содержит аминокислотная последовательность, включающая одну или более гидрофобных трансмембран последовательности, указанные выше. Изобретение включает полипептид содержащий фрагмент SEQ ID NO: 6039, в котором указанный фрагмент содержит одна или несколько из следующих полипептидных последовательностей SEQ ID NO: 6039: 473-488; 529-549, 584-606, 773-791, 2098-2119, 2145-2160, 2206-2224, 2316-2332, 2335-2358, 2373-2390, 2753-2770, 2831-2854, 2879-2990, 2990-3012, 3024-3042, 3054-3075, 3105-3127, 3438-3455, 3559-3584, 3589-3606, 3611-3629, 3659-3674, 3756-3777, 473-488, 583-606, 776-791, 2098-2119, 2208-2231, 2309-2332, 2342-2368, 2753-2770, 2832-2854, 2990-3005, 3020-3042, 3059-3075, 3105-3127, 3142-3162, 3437-3453, 3560-3577, 3591-3606, 3610-3627, 3656-3678, 3710-3738, 3723-3738, и еще ... 3760-3777. Предпочтительно, чтобы фрагмент содержал один или несколько из следующих элементов: следующие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 6039: 2206-2224, 2316-2332, 2335-2358, 2753-2770, 3024-3042, 3054-3075, 3105-3127, 3589-3606, 3611-3629, 3756-3777, 2208-2231, 2753-2770, 3020-3042, 3059-3075, и еще ... 3591-3606. Предпочтительно, чтобы фрагмент содержал один или несколько из следующих элементов: следующие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 6039: 2206-2224 и 3020-3042. Изобретение также включает полинуклеотиды, кодирующие каждый из полипептидных фрагментов идентифицированы выше.

[0172] изобретение включает аттенуированный вирус SARS, в котором указанный вирус является аттенуированным вирусом атеросклероза. аттенуированный вирус ОРВИ содержит добавление, удаление или замену в полинуклеотиды, кодирующие один из гидрофобных доменов указанный выше. Изобретение также включает в себя способ создания аттенуированный вирус ОРВИ, содержащий мутацию вируса ОРВИ путем добавления, удаление или замена вирусного генома вируса атипичной пневмонии для изменения кодирование одного или нескольких гидрофобных доменов SEQ ID NO: 6039 указанный выше.

[0173] изобретение включает антитело, которое специфически идентифицирует одна или несколько гидрофобных областей SEQ ID NO: 6039 идентифицировано выше. Изобретение включает в себя небольшую молекулу, которая связывается, интерферирует с hydrophobicity или в противном случае нарушает одно или больше из гидрофобные области SEQ ID NO: 6039 идентифицировано выше.

[0174] определены прогнозируемые участки N-гликозилирования SEQ ID NO: 6039 на диаграмме ниже.

[0175] прогнозирование участков N-гликозилирования в SEQ ID NO: 6039 ТАБЛИЦА-США-00002 Jury NGLyc Позиция потенциальный результат соглашения 48 NGTC SEQ ID NO: 7180 0.6371 (7/9) + 389 NHSN SEQ ID NO: 7181 0.6132 (6/9) + 916 NFSS SEQ ID NO: 7182 0,5807 (7/9) + 1628 NHTK SEQ ID NO: 7183 0.5610 (7/9) + 1696 NKTV SEQ ID NO: 7184 0.5297 (5/9) + 2031 NPTI SEQ ID NO: 9764 0.5299 (5/9) + ВНИМАНИЕ: PRO- X1. 2249 NSSN SEQ ID NO: 7185 0.6329 (9/9) ++ 2459 NPTD SEQ ID NO: 9765 0.5599 (6/9) + ВНИМАНИЕ: PRO- X1. 2685 NVSL SEQ ID NO: 7186 0.6071 (8/9) + 4233 NATE SEQ ID NO: 7187 0.6144 (7/9) +

[0176] соответственно изобретение содержит фрагмент SEQ ID NO: 6039 где указанный фрагмент содержит аминокислотную последовательность, включающую одну или больше из мест N-гликозилирования определенных выше. Желательно, чтобы фрагмент содержит одну или несколько последовательностей, выбранных из группы состоящий из SEQ ID NOS: 7180-7187 & 9764-9765. Желательно, чтобы фрагмент содержит аминокислотную последовательность NSSL (SEQ ID NO: 7185).

[0177] изобретение включает полипептид, содержащий фрагмент SEQ ID нет: 6039 где указанный фрагмент не включает в себя один или несколько из следующих фрагментов: сайты гликозилирования определены выше. Изобретение также включает в себя полинуклеотид, кодирующий такой полипептид.

[0178] Т-эпитопы для SEQ ID NO: 6039 идентифицированы в таблице 13. То изобретение включает в себя полипептид для использования в качестве антигена, причем полипептид содержит: (а) аминокислотную последовательность, выбранную из группы состоящий из последовательностей Т-эпитопа, идентифицированных как SEQ ID NOS: 7400-7639; (б) аминокислотная последовательность, имеющая тождество последовательности с Ан аминокислотная последовательность (а). Изобретение дополнительно содержит а полинуклеотидная последовательность, кодирующая полипептиды (а) или (б). То изобретение дополнительно содержит способ выражения или доставки такого выражения полинуклеотиды через вирусные векторы и / или вирусные частицы. То изобретение дополнительно содержит полипептид, содержащий два или более из следующих компонентов: Т-эпитопные последовательности идентифицированы как SEQ ID NOS: 7400-7639, или а полинуклеотид, кодирующий такой полипептид.

[0179] использование в качестве антигена предпочтительно использовать: (1) в качестве Т-клетки антиген; (2) для генерирования комплекса между белком МНС класса I (например а class I HLA) и фрагмент указанного антигена; (3) в качестве антигена для повышение клеточно-опосредованного иммунного ответа; и / или (4) в качестве антигена для повышение ответа CTL. Польза предпочтительно защищает или обрабатывает заболевание и / или инфекция, вызванная вирусом SARS.

[0180] изобретение предусматривает применение полипептида в производстве лекарственного средства для иммунизации млекопитающего (обычно человека) против ОРВИ вирусная инфекция где полипептид как определено выше.

[0181] в изобретении предложен способ повышения иммунного ответа у человека, находящегося в состоянии покоя. млекопитающее (как правило, человек), включающее в себя этап введения в организм млекопитающее а полипептид, как определено выше, где указанный иммунный ответ представляет собой клеточно-опосредованный иммунный ответ и, предпочтительно, реакция CTL. Иммунная система ответ является предпочтительно защитным или терапевтическим.

[0182] последовательности коронавируса ORF1a и ORF1b обычно являются переводится как один полипротеин ORF1ab. Проскальзывание рибосомы во время трансляции генерирует смещение кадров а-1. Один из таких регионов проскальзывание показано ниже: ТАБЛИЦА-США-00003
gggtttacttagaacaacagctctgacgtctgcggaatgtggaagggttatggctgtgtgga +1 Г Ф Т Л Р Н Т В С Т В С Г М К З Г Г Г Б С Д +3 Г Ф М Т - О Т К Р Ы Л Г Р Л Р П В Е
Р Д Ж Л - Л - ссаactccgcaaccccttgatgagcagtgccgatcattcaacgttttaaacgggttgcgggtgtgtaagt +1 Q L R E P L M Q S A D A S T F L N G F A V - V +3 П Т П Р Т Л Д А В
С Г С Я Н В Ф К Р В С Г В С gcaagccctctaccctgctgagcagcactagctctg (SEQ ID NO: 7224) +1 Q P V L H R A Q A L V L (SEQ ID NOS: 7225-7226) +3 A A R
L T P C G T G T S T (SEQ ID NOS: 7227-7229)

[0183] что бы генерировать следующее поступательное проскальзывание (SEQ ID Номер телефона: 7230-7231): ТАБЛИЦА-США-00004
ссаactccgcaaccccttgatgagcagtgccgatcattcaacgttttaaacgggttgcgggtgtgtaagt К Л Ю Ч Е В Ы Е С Л О В А Д А Т Е Л Ь Н О С Т В А

[0184] соответственно изобретение включает полипептид, содержащий SEQ ID NO: 7232. Изобретение включает полипептид, содержащий аминокислотная последовательность, имеющая идентификатор последовательности для SEQ ID NO: 7232. Изобретение включает фрагмент полипептида, содержащего SEQ ID NO: 7232 The изобретение включает диагностический набор, содержащий полипептид, содержащий SEQ ID NO: 7232 или его фрагмент. Изобретение включает в себя: диагностический набор, содержащий полинуклеотидную последовательность, кодирующую SEQ ID NO: 7232 или его фрагмент. Изобретение относится к иммуногенным препаратам композиция, содержащая полипептид, содержащий SEQ ID NO: 7232 или а фрагмент его. Изобретение включает антитело, которое распознает а полипептид, содержащий SEQ ID NO: 7232 или его фрагмент.

[0185] изобретение также включает полипептид, содержащий аминокислоту последовательность X. sub.1--X. sub.2--X. sub.3, где X. sub.1-SEQ ID NO: 7233, X. sub.2 - это от одной до десяти аминокислот, а X. sub.3-это SEQ ID NO: 7234. X. sub.2 может содержать любую последовательность от одной до десяти аминокислот (SEQ ID NOS: 7235-7244), но в предпочтительных вариантах осуществления X. sub.2 выбирается из списка группа, состоящая из F, FL, FLN, FLNR (SEQ ID NO: 7245), FLNRV (SEQ ID NO: 7246) и FLNRVC (SEQ ID NO: 7247). Предпочтительно, X. sub.2 is SEQ ID NO: 7247. Эти предпочтительные варианты показаны как SEQ ID NOS: 7248-7253.

[0186] изобретение включает полипептид, содержащий аминокислоту последовательность, имеющая идентичность последовательности к указанным аминокислотным последовательностям X. sub.1--X. sub.2--X. sub.3. Изобретение включает в себя фрагмент а полипептид, содержащий указанные аминокислотные последовательности X. sub.1--X. sub.2--X. sub.3. Изобретение включает диагностический набор содержащий полипептид, содержащий указанные аминокислотные последовательности X. sub.1--X. sub.2--X. sub.3 или его фрагмент. Изобретение включает в себя: диагностический набор, содержащий полинуклеотидную последовательность, кодирующую указанный аминокислотные последовательности X. sub.1--X. sub.2--X. sub.3 или его фрагмент. То изобретение включает иммуногенную композицию, содержащую полипептид содержит указанные аминокислотные последовательности X. sub.1--X. sub.2--X. sub.3 или а фрагмент его. Изобретение включает антитело, которое распознает а полипептид, содержащий указанные аминокислотные последовательности X. sub.1--X. sub.2--X. sub.3 или его фрагмент.

[0187] аминокислотные последовательности X. sub.1--X. sub.2--X. sub.3 (т. е. SEQ ID NOS: 7235-7244) демонстрируют функциональную гомологию с полипротеином вирус мышинного гепатита. Этот полипротеин расщепляется для получения нескольких белковая пища. Протеины которые можно произвести от X. sub.1--X. sub.2--X. sub.3 полипротеин, где X. sub.2 - это шесть аминокислот (SEQ ID NO: 7240) перечислены ниже. ТАБЛИЦА-США-00005 Координаты в городе Координаты белка вируса мыши в вирусе мыши SEQ ID нет: 7240 Nsp2 3334-3636 3241-3546 Nsp3 3637-3923 3547-3836 Nsp4 3924-4015 (или 4012) 3837-3919 Nsp5 4016 (или 4013)-4209 3920-4117 Nsp6 4210-4319 4118-4230 Nsp7 4320-4456 4231-4369 Nsp9 4457-5384 4370-5301 Nsp10 5385-5984 5302-5902 Nsp11 5985-6505 5903-6429 Nsp12 6506-6879 6430-6775 Nsp13 6880-7178 6776-7073

[0188] изобретение включает фрагмент аминокислотной последовательности X. sub.1--X. sub.2--X. sub.3 (т. е. SEQ ID NOS: 7235-7244) где фрагмент содержит одну из полипептидных последовательностей, идентифицированных в вышеуказанная таблица. Изобретение дополнительно включает фрагмент аминокислоты последовательности X. sub.1--X. sub.2--X. sub.3 где указанный фрагмент содержит а полипептидную последовательность, имеющая Серин на своем N-конце и глутамин на его с-конце. Изобретение дополнительно включает фрагмент аминокислотная последовательность X. sub.1--X. sub.2--X. sub.3 где указанный фрагмент содержит а последовательность полипептида которая имеет аланин на своем N-конце и а глутамин на своем C-конце. Изобретение дополнительно включает в себя фрагмент аминокислотная последовательность X. sub.1--X. sub.2--X. sub.3 где указанный фрагмент содержит последовательность полипептида которая имеет аспарагин на своем N-конце и глутамин на его с-конце. Изобретение дополнительно включает в себя фрагмент аминокислотной последовательности X. sub.1--X. sub.2--X. sub.3 где: указанный фрагмент содержит цистеин на его N-конце и глутамин на его C-конечная точка. Каждый из фрагментов, идентифицированных выше, может быть использован в белок слияния.

[0189] изобретение включает диагностический набор, содержащий полипептид содержащий по меньшей мере один из фрагментов аминокислотной последовательности X. sub.1--X. sub.2--X. sub.3 (т. е. SEQ ID NOS: 7235-7244), идентифицированные в предыдущий абзац. Изобретение включает диагностический набор, содержащий: полинуклеотидная последовательность, кодирующая по меньшей мере один из фрагментов аминокислотная последовательность X. sub.1--X. sub.2--X. sub.3 обозначенные выше параграф. Изобретение включает иммуногенную композицию, содержащую а полипептид, содержащий по меньшей мере один из фрагментов аминокислоты последовательности X. sub.1--X. sub.2--X. sub.3 указаны в приведенном выше пункте. То изобретение включает антитело, которое распознает полипептид, содержащий по крайней мере один из фрагментов аминокислотной последовательности X. sub.1--X. sub.2--X. sub.3 указаны в приведенном выше пункте.

[0190] предсказанные N-гликозилирующие участки аминокислотной последовательности X. sub.1--X. sub.2--X. sub.3 когда X. sub.2 is шесть аминокислот идентифицированы у аспарагинов, расположенных в следующих аминокислотных позициях 48; 389; 556; 916; 1628; 1696; 1899; 2079; 2249; 2252; 2507; 2685; 3303; 3373; 3382; 3720; 4150; 4233; 4240; 5016; 5280; 5403; 5558; 5650; 5905; 6031; 6130; 6474; 6918; 6973. Соответственно, изобретение содержит фрагмент из SEQ ID NO: 7239, где указанный фрагмент представляет собой по меньшей мере десять аминокислот и где указанный фрагмент содержит один или несколько аспарагинов из группы: аминокислотные позиции SEQ ID NO: 7239 выбрано из группы состоит из: 8; 389; 556; 916; 1628; 1696; 1899; 2079; 2249; 2252; 2507; 2685; 3303; 3373; 3382; 3720; 4150; 4233; 4240; 5016; 5280; 5403; 5558; 5650; 5905; 6031; 6130; 6474; 6918; и 6973.

[0191] цинк связывающая область 2 место внутри SEQ ID NOS: 7235-7244 is идентифицировано по аминокислотным остаткам 2102-2112 (SEQ ID NO: 7254 HGIAAINSVPW). Полипептид SEQ ID NOS: 7235-7244 будет обработан по вирусу атипичной пневмонии в несколько пептидов. Этот цинк связывающая область падает в пределах области nsp1 полипептида. SEQ ID NO: 7254 является целью для скрининга химических ингибиторов на вирус ОРВИ. Изобретение включает полипептид состоит из SEQ ID NO: 7254. Изобретение включает в себя: полинуклеотид, кодирующий полипептидную последовательность SEQ ID NO: 7254. Изобретение включает способ экранирования SEQ ID NO: 7254 для Ан ингибитор. Изобретение включает рекомбинантную экспрессию SEQ ID Нет: 7254 в клетке-хозяине. Изобретение включает фрагмент SEQ ID NOS: 7235-7244, где указанный фрагмент содержит SEQ ID NO: 7254. Изобретение включает полипептид, содержащий SEQ ID NO: 7254, где указанный полипептид комплексован с Ионом цинка. Изобретение включает в себя небольшой молекула, препятствующая комплексообразованию Иона цинка с полипептидом из SEQ ID NO: 7254. Изобретение включает в себя белок слияния, в котором упомянуты: протеин сплавливания состоит из SEQ ID NO: 7254.

[0192] полипротеин, кодируемый вирусом SARS, будет содержать по меньшей мере 2 домена протеазы: папаин-как протеаза цистеина (PLP) и а химотрипсин-ликорнавирусная 3С-подобная протеаза (3CLp). (Там может быть и больше чем одна копия домена PLP). Эти протеазы действуют для того чтобы расщепить полипротеин в несколько более мелких белков. 3С-подобная протеаза, также известный как "основная протеаза" или Mpro, сам расщепляется от полипротеин по собственной активности аутопротеазы. См. вообще главу 35. из области вирусологии (2-е изд.), Fields et al. (ЭЦП.), B. N. Raven Press, New York, N. Y., and Anand et al., EMBO Journal (2002) 21 (13): 3213-3224. Этот 3CLp обычно соответствует области Nsp2, указанной выше.

[0193] белок вируса SARS 3CLp дополнительно характеризуется SEQ ID NO: 6569 (также SEQ ID NO: 9769), как показано на фиг. 15.

[0194] FIG. 16 также иллюстрирует вирус SARS 3CLp, в alignment с 3CLp птичьего инфекционного бронхита (IBV; SEQ ID NO: 6570), мышьяк вирус гепатита (MHV; SEQ ID NO: 6571) и коронавируса крупного рогатого скота (BCoV; SEQ ID NO: 6572). Соответственно, изобретение включает полипептидную последовательность содержащий SEQ ID NO: 6569, или его фрагмент, или полипептид последовательность, имеющая к ней идентичность последовательности. Изобретение дополнительно включает в себя полинуклеотидная последовательность, кодирующая SEQ ID NO: 6569, или фрагмент из этого. Изобретение включает полинуклеотидную последовательность, кодирующую а полипептидная последовательность, имеющая идентичность последовательности SEQ ID NO: 6569.

[0195] изобретение дополнительно включает способ скрининга для Ан - ингибитор белка вируса ОРВИ 3CLp. В одном варианте осуществления, the изобретение включает способ скрининга на наличие ингибитора SEQ ID NO: 6569. Изобретение включает способ рекомбинантного экспрессирования Белок вируса ОРВИ 3CLp в клетке-хозяине. Изобретение включает в себя способ рекомбинантно экспрессирующей полипептидную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 6569 или его ферментативно активный фрагмент, или полипептид последовательность, имеющая к ней идентичность последовательности. Изобретение включает в себя небольшой молекула, ингибирующая или снижающая протеолитическую активность при ОРВИ белок вируса 3CLp. Изобретение включает в себя небольшую молекула, которая ингибирует или снижает протеолитическую активность полипептида состоит из SEQ ID NO: 6569.

[0196] каталитические остатки вируса торс 3CLp идентифицированы на фиг. 15 и 16. В частности, каталитический гистидин и каталитический цистеин идентифицируются. Такие каталитические сайты являются мишенями для малых молекул что смогло заблокировать или уменьшить деятельность при протеазы 3CLp. Соответственно, изобретение включает полипептид, содержащий фрагмент SEQ ID NO: 6569, где указанный фрагмент содержит по меньшей мере один каталитический сайт. Предпочтительно, каталитический сайт выбирается из группы, состоящей из указанный каталитический гистидин и каталитический цистеин представлены на фиг. 15 и еще 16. Изобретение включает полинуклеотид, кодирующий полипептид, где указанный полипептид содержит фрагмент SEQ ID NO: 6569, где указанный фрагмент содержит по меньшей мере один каталитический сайт. Желательно, чтобы каталитический сайт выбирается из группы, состоящей из указанный каталитический гистидин и каталитический цистеин.

[0197] изобретение дополнительно включает способ экранирования соединения библиотека для идентификации небольшой молекулы, которая входит в каталитический сайт А Вирус ОРВИ ЗСЛр. Предпочтительно, ЗСЛр содержит SEQ ID NO: 6569, или а его фрагмент или последовательность, имеющая к нему идентичность последовательности. То каталитический сайт предпочтительно выбирают из группы, состоящей из указаны каталитический гистидин и каталитический цистеин на фиг. 15 и 16.

[0198] изобретение включает в себя небольшую молекулу, которая ингибирует каталитический сайт вируса ОРВИ ЗСЛр. Предпочтительно, ЗСЛр содержит SEQ ID NO: 6569, или его фрагмент, или последовательность, имеющая последовательность тождественность этому. Каталитический сайт предпочтительно выбирается из группа, состоящая из указанного каталитического гистидина и катализатора цистеин на фиг. 15 и 16.

[0199] остатки субстратного сайта вируса торс ЗСЛр являются идентифицировано на фиг. 15 и 16. В частности, указывается место подложки у фенилаланина, тирозина и гистидина. Такими субстратными участками являются мишени для малых молекул, которые могут ингибировать или уменьшать протеазу активность ЗСЛр. Соответственно, изобретение включает в себя полипептид содержащий фрагмент SEQ ID NO: 6569, где указанный фрагмент содержит: по крайней мере, один участок субстрата. Предпочтительно, чтобы был выбран участок подложки из группы, состоящей из указанного субстрата фенилаланина, тирозин и гистидин на фиг. 15 и 16. Изобретение включает в себя: полинуклеотид, кодирующий полипептид, в котором указанный полипептид содержит фрагмент SEQ ID NO: 6569, где указанный фрагмент содержит по меньшей мере один субстратный участок. Предпочтительно, место субстрата выбрано от группа, состоящая из указанного субстрата фенилаланина, тирозина и гистидин на фиг. 15 и 16.

[0200] изобретение дополнительно включает способ экранирования соединения библиотека для идентификации небольшой молекулы, которая блокирует участок субстрата А Вирус ОРВИ ЗСЛр. Предпочтительно, ЗСЛр содержит SEQ ID NO: 6569, или а его фрагмент или последовательность, имеющая к нему идентичность последовательности. То субстратный участок предпочтительно выбирают из группы, состоящей из указанный субстрат фенилаланин, тирозин и гистидин представлены на фиг. 15 и 16.

[0201] изобретение включает в себя небольшую молекулу, которая ингибирует субстратный сайт вируса ОРВИ ЗСЛр. Предпочтительно, ЗСЛр содержит SEQ ID NO: 6569, или его фрагмент, или последовательность, имеющая последовательность тождественность этому. Место субстрата предпочтительно выбрано от группа, состоящая из указанного субстрата фенилаланина, тирозина и гистидин на фиг. 15 и 16.

[0202] изобретение дополнительно включает диагностический набор, содержащий а полинуклеотид, кодирующий вирус SARS ЗСЛр или его фрагмент. Предпочтительно, вирус SARS ЗСЛр, содержащий SEQ ID NO: 6569 или фрагмент его или полипептидную последовательность, имеющую тождественную ей последовательность. Предпочтительно, чтобы фрагмент, содержащий один или несколько сайтов, выбранных из группа, состоящая из каталитического участка и участка подложки. Предпочтительно, каталитический сайт выбирается из группы, состоящей из одного или нескольких компонентов из объектов, обозначенных на фиг. 15 и 16. Предпочтительно, субстратный сайт выбирается из группы, состоящей из одного или нескольких сайтов идентифицировано на фиг. 15 и 16.

[0203] изобретение дополнительно содержит диагностический набор, содержащий антитело, специфичное к вирусу ОРВИ ЗСЛр или его фрагменту. Предпочтительно, антитело специфично к полипептиду состоя из SEQ ID NO: 6569 или фрагмент их или полипептидная последовательность, имеющая идентичность последовательности к этому. Предпочтительно, антитело специфично к одному или нескольким участкам А Вирус SARS ЗСЛр, выбранный из группы, состоящей из каталитического сайта и субстратный сайт. Предпочтительно, каталитический сайт выбран от группа, состоящая из одного или нескольких объектов, указанных на фиг. 15 и 16. Предпочтительно, чтобы участок подложки выбирался из группы, состоящей одного или нескольких объектов, указанных на фиг. 15 и 16.

[0204] изобретение включает полипептид, содержащий аминокислоту последовательность из последовательности, показанной на фиг. 25. Две аминокислотные последовательности внутри рис. 25, разделенные а *, являются SEQ ID NOS: 7188 & 7189. То изобретение включает полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую тождество последовательности на фиг. 25 перевод. Изобретение включает в себя: фрагмент полипептида, содержащего фиг. 25 последовательность. Изобретение включает в себя диагностический набор, содержащий полипептид, содержащий фиг. 25 перевод или его фрагмент. Изобретение включает диагностику набор, содержащий полинуклеотидную последовательность, кодирующую фиг. 25 перевод или его фрагмент. Изобретение относится к иммуногенным препаратам композиция, содержащая полипептид, включающий фиг. 25 перевод, или его фрагмент. Изобретение включает антитело, которое распознает полипептид, содержащий фиг. 25 последовательность, или фрагмент из этого. инжир. 25 последовательность демонстрирует функциональную гомологию с ORF1b из-за коронавирусов.

[0205] SEQ ID NO: 7188-это открытая рамка считывания внутри илл. 25. То изобретение включает полипептид, содержащий SEQ ID NO: 7188. То изобретение включает полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую идентификатор последовательности для SEQ ID NO: 7188. Изобретение включает в себя фрагмент полипептида, содержащего SEQ ID NO: 7188. Изобретение включает в себя: диагностический набор, содержащий полипептид, содержащий SEQ ID NO: 7188, или а фрагмент его. Изобретение включает диагностический набор, содержащий: полинуклеотидная последовательность, кодирующая SEQ ID NO: 7188, или ее фрагмент. Изобретение включает иммуногенную композицию, содержащую а полипептид, содержащий SEQ ID NO: 7188, или его фрагмент. То изобретение включает антитело, которое распознает полипептид, содержащий SEQ ID NO: 7188, или его фрагмент.

[0206] SEQ ID NO: 7190-это открытая рамка считывания в SEQ ID NO: 7188. Изобретение включает полипептид, содержащий SEQ ID NO: 7190, а его фрагмент или полипептид, имеющий идентичную ему последовательность. То изобретение дополнительно включает полинуклеотид, кодирующий SEQ ID NO: 7190, а фрагмент его или полипептидная последовательности, имеющая идентичность последовательности к этому. Приведен пример полинуклеотида, кодирующего SEQ ID NO: 7190 как SEQ ID NO: 7191.

[0207] SEQ ID NO: 7188 также содержит открытую рамку считывания, содержащую SEQ ID NO: 6042. Изобретение включает полипептид, содержащий SEQ ID NO: 6042. Изобретение включает полипептид, содержащий аминокислоту последовательность, имеющая идентификатор последовательности для SEQ ID NO: 6042. Изобретение включает фрагмент полипептида, содержащего SEQ ID NO: 6042. То изобретение включает диагностический набор, содержащий полипептид, содержащий SEQ ID NO: 6042, или его фрагмент. Изобретение включает в себя: диагностический набор, содержащий полинуклеотидную последовательность, кодирующую SEQ ID NO: 6042, или его фрагмент. Изобретение относится к иммуногенным препаратам композиция, содержащая полипептид, содержащий SEQ ID NO: 6042, или а фрагмент его. Изобретение включает антитело, которое распознает а полипептид, содержащий SEQ ID NO: 6042, или его фрагмент. SEQ ID HET: 6042 демонстрирует функциональную гомологию к протеину шипа коронавируса.

[0208] определены прогнозируемые трансмембранные области SEQ ID NO: 6042 ниже.

Прогнозируемые трансмембранные спирали SEQ ID NO: 6042

[0209] позиции последовательности в скобках обозначают основную область.

[0210] значимыми считаются только баллы выше 500. ТАБЛИЦА-США-00006 от к центру счета Внутри и снаружи спирали: найдено 18 1 (1) 16 (16) 959 9 233 (237) 257 (252) 905 244 345 (347) 364 (361) 490 354 345 (354) 369 (369) 420 362 497 (497) 513 (513) 239 506 573 (573) 588 (588) 811 580 645 (648) 666 (663) 302 656 690 (696) 714 (711) 428 704 857 (860) 882 (874) 1508 867 1031 (1031) 1046 (1046) 446 1039 1199 (1203) 1219 (1217) 2667 1210 Снаружи-внутри спирали: найдено 13 1 (1) 17 (17) 684 10 222 (222) 240 (237) 238 229 244 (247) 264 (264) 613 254 349 (355) 369 (369) 314 362 496 (496) 511 (511) 488 503 573 (573) 591 (591) 712 581 650 (652) 666 (666) 474 659 674 (679) 702 (696) 190 686 691 (696) 713 (711) 210 704 866 (868) 886 (886) 1172 876 1198 (1201) 1215 (1215) 3221 1208

[0211] SEQ ID NO: 6042, спайковый белок, является открытой поверхностью полипептид. Рекомбинантная экспрессия белка может быть затруднена путем гидрофобные трансмембранные области. Соответственно, изобретение включает в себя полипептид, содержащий SEQ ID NO: 6042, в котором один или

более из гидрофобные области, указанные выше, удаляются. Изобретение далее включает в себя полинуклеотид, кодирующий такой полипептид. Изобретение включает рекомбинантно экспрессирующий белок в клетке-хозяине. Грунтовки для амплификации гена спайкового белка и его фрагментов, таких как: фрагменты, кодирующие растворимый эктодомен, включают SEQ ID NOS: 9753-9763 (Xiao et al. (2003) Biochem Biophys Res Comm 312: 1159-1164).

[0212] Ниже приводится дополнительная характеристика SEQ ID NO: 6042. ТАБЛИЦА-США-00007 PSORT - - - прогнозирование участков локализации белка версия 6.4 (WWW) SEQ ID NO: 6042-1255 остатки Классификация видов: 4 *** Шаг Рассуждения: 1 Предварительный расчет ALOM (порог: 0.5) количество: 2 Положение самого N-образного терминала TMS: 496 при i = 2 МТОР: топология мембраны (Hartmann et al.) И (середина): дифференс обязанности 503 (K - H): 1,0 McG: изучение последовательности сигналов (McGeoch) Длина UR: 13 Пиковое значение UR: 3.28 Чистый заряд CR: 0 Дискриминантный Балл: 8.66 GvH: изучение последовательности сигналов (von Heijne) Оценка Сигнала (-3.5): 5.94 Возможное место расщепления: 13 > > > > Похоже, что у расщепляемого N-терм сигнала seq. Аминокислотный состав прогнозируемой зрелой формы: рассчитано от 14 ALOM new cnt: 1 * * thrshld изменен на -2 Расщепляемый сигнал был обнаружен в ALOM?: 0B ALOM: поиск трансмембранных областей (Klein et al.) количество: 1 значение: -12.26 порог: -2.0 Интегральное правдоподобие = -12,26 Трансмембрана 1202-1218 (1194-1228) Периферийное правдоподобие = 0,16 модифицированный балл ALOM: 2.55 > > > > > Похоже, что это мембранный белок типа Ia Цитоплазматический хвост находится от 1219 до 1255 (37 остатков) Правило: везикулярный путь Правило: везикулярный путь Правило: везикулярный путь (14) или неразрешимый? Молоток: изучение границы митохондриального таргетинга seq. мотив по адресу: 14 Неразрешимый вопрос? IPO установлено на: 24 Дискриминация митохондриальной мишени seq.: положительный (2.18) Правило: везикулярный путь Правило: везикулярный путь Правило: везикулярный путь *** Шаг Рассуждения: 2 Количество KDEL: 0 Контроль аполярного сигнала для внутримитохондриальной сортировки (Положение молотка 24) от: 1 до: 10 оценка: 8,0 СКЛ-мотив (сигнал для пероксисомного белка): pos: 964 (1255), количество: 1 SRL Оценка SKL (peroxisome): 0.1 Тенденция состава аминокислоты для пероксисомы: 1.37 AAK не из числа N-термов., оценка изменена Пероксисомные белки? Статус: notclr Оценка AAC (peroxisome): 0.079 Тенденция аминокислотного состава для лизосомальных белков оценка: 0.39 статус: notclr GY мотив в хвосте tyrela? (лизосомальный) <succ> микробное тело (пероксисома) - - - определенность = 0,171 (утвердительный ответ) <succ> эндоплазматический ретикулум (мембрана) - - - достоверность = 0,100 (утверительно) < succ> эндоплазматический ретикулум (просвет) --- достоверность = 0,100 (утверительно) < succ>

[0213] SEQ ID NO: 6042, по-видимому, имеет N-концевую сигнальную область, затем следует поверхностная открытая область, за которой следует трансмембранная область затем следует область цитоплазматического домена с-конца. Соответственно, изобретение включает иммуногенный, поверхностно экспонированный фрагмент SEQ ID NO: 6042. Предпочтительно, чтобы указанный фрагмент содержал аминокислотную последовательность, которая не включает в себя последние 50 аминокислот С-конца SEQ ID нет: 6042. Предпочтительно, чтобы указанный фрагмент содержал аминокислотную последовательность, которая не включает в себя последние 70 аминокислот С-конца SEQ ID NO: 6042. Предпочтительно, чтобы указанный фрагмент не включал трансдоменную область SEQ ID NO: 6042. Предпочтительно, чтобы указанный фрагмент не включал в себя С-концевую точку цитоплазматический домен SEQ ID NO: 6042. Предпочтительно, указанный фрагмент не имеет включите последовательность сигнала N-terminus. Предпочтительно, указанный фрагмент не имеет включите аминокислоты 1-10 из N-terminus SEQ ID NO: 6042. Предпочтительно, чтобы указанный фрагмент не включал аминокислоты 1-14 из N-конечная точка SEQ ID NO: 6042. Два олигопептидных фрагмента SEQ ID нет: 6042 которые могли выпытать антитела анти -- шипа по ID SEQ: 7398 & 7399, как описано (с дополнительными с-концевыми цистеинами) Xiao et al. (2003) Biochem Biophys Res Comm 312:1159-1164. С-терминальные усечения спайковый белок, с удалением части цитоплазматической области, или удалением до и включая трансмембранную область, описаны Yang et Аль. (2004) Nature 428:561-564.

[0214] вариант SEQ ID NO: 6042, включенный в изобретение is SEQ ID NO: 9962. По сравнению с SEQ ID NO: 6042, эта последовательность имеет Ser at выпарка 581 вместо Ala, и имеет Phe на выпарке 1152 вместо Leu.

[0215] спайковый белок коронавирусов может расщепляться на два разделите цепи на S1 и S2. Цепи могут оставаться связанными вместе чтобы сформировать димер или тример. Соответственно, изобретение включает в себя полипептид, содержащий SEQ ID NO: 6042, где указанный полипептид был расщепляется на домены S1 и S2. Изобретение дополнительно включает в себя полипептид, содержащий SEQ ID NO: 6042, где аминокислоты 1-10, предпочтительно аминокислоты 1-14 из N-концевой части удаляются и далее где SEQ ID NO: 6042 расщепляется на домены S1 и S2. Предпочтительно, чтобы полипептид находится в форме тримера.

[0216] кажется, что формирует протеин шипа Альфа-спиральную структуру внутри трансмембранная область белка, предпочтительно в домене S2. Эта Альфа-спиральная структура, как полагают, ассоциируется по меньшей мере с двумя дополнительные спайковые белки образуют тример. Спиральные или спиральные области белка Спайка идентифицируется ниже. Прогнозируемые спиральные катушки SEQ ID Нет: 6042 (спайковый белок) находятся на аминокислотах 900-1005 и 1151-1185 (см. ИНЖИР. 12).

[0217] соответственно изобретение содержит полипептидную последовательность содержащий фрагмент SEQ ID NO: 6042, где указанный фрагмент включает в себя спиральная область SEQ ID NO: 6042. Указанный фрагмент предпочтительно включает в себя аминокислотные последовательности, выбранные из группы, состоящей из аминокислоты позиции от 900 до 1005 и аминокислотные позиции от 1151 до 1185 из SEQ ID нет: 6042. Изобретение содержит полипептидную последовательность, содержащую а фрагмент SEQ ID NO: 6042, где указанный фрагмент не включает а спиральная область SEQ ID NO: 6042. Указанный фрагмент предпочтительно включает в себя аминокислотные последовательности, выбранные из группы, состоящей из аминокислоты позиции от 900 до 1005 и аминокислотные позиции 1151 и 1185 из SEQ ID Нет: 6042.

[0218] считается, что спайковый белок играет неотъемлемую роль в слиянии а также заражение коронавирусами клеток-хозяев млекопитающих. Анализ данных спайковые белки коронавируса, а также аналогичные поверхностные белки в других странах вирусы выявили по меньшей мере два структурных мотива, как правило, расположенных в домене S2, связанном с этим событием слияния: heptad повторяется (XP) и пептиды сплавления мембраны.

[0219] по крайней мере два гидрофобных гептадных домена повтора 4,3 (HR) являются обычно встречается в эктодомене домена S2 коронавирусов. Один область повтора гептады (HR1) обычно расположена рядом со слиянием пептид пока вторая зона гептад (XP2) типично расположена около С-конечная точка домена S2, близкая к трансмембранному якорю. Гептад повторы характерны для спирально-катушечных структур и семядолей повторы, обнаруженные в вирусных поверхностных белках (таких как Спайк коронавируса протеин) подуманы, что формирует связанные структуры винтовой линии которые включаются в вирусной записи. Смотрите Bosch et al., J. Вирусология (2003) 77:8801-8811 (рис. 1В этой ссылки иллюстрирует выравнивание областей HR1 и HR2 из пяти коронавирусов наряду с ОРВИ, аннотированных "HCov-SARS").

[0220] гептад повторы обычно содержат повторяющуюся структуру из семи аминокислоты, обозначенные a-b - c-d-e-f-g, где гидрофобные боковые цепи выпарки a и d типично формируют аполярную нашивку, и электростатический взаимодействия обнаруживаются в остатках e и G. положение a встречается наиболее часто Leu, Пе или Ala и положение e обычно Leu или Ala. Остатки e и g часто Glu или Gln, с Arg и Lys также видно на положении g. Заряженные остатки являются общими для позиций b, c и f, поскольку эти остатки могут быть в контакте с растворителем. Исключения из этих общих параметров являются известный. Например, остатки Pro иногда встречаются в пределах гептады.

[0221] последовательности HR1 и HR2 штамма MHV были постулированы к соберите в термостабильный, олигомерный, альфаэлический роддоподобный комплекс, при спирали HR1 и HR2 ориентированные в antiparallel образе. ID. В это же исследование, HR2 был заявлен, чтобы быть сильным inhibitor обоих вирусов вход в клетку и слияние клетка-Клетка.

[0222] последовательности HR1 и HR2 были идентифицированы в вирусе торс геном. Область вируса ОРВИ HR1 содержит приблизительно аминокислоты 879 до 1005 из SEQ ID NO: 6042 или его фрагментов, способных образовываться при хотя бы один альфа-спиральный поворот. Предпочтительно, чтобы указанные фрагменты содержали не менее не менее 7 (например, не менее 14, 21, 28, 35, 42, 49 или 56) аминокислота остатки. SEQ ID NO: 7192, включает аминокислоты от 879 до 1005 SEQ ID NO: 6042.

[0223] предпочтительный фрагмент HR1 содержит аминокислотные остатки от 879 до 980 из SEQ ID NO: 6042. Этот предпочтительный фрагмент является SEQ ID NO: 7193.

[0224] другой предпочтительный фрагмент HR1 содержит аминокислотные остатки 901 до 1005 из seq ID NO: 6042. Этот предпочтительный фрагмент является SEQ ID NO: 7194.

[0225] область HR2 вируса SARS содержит приблизительно аминокислоты 1144 до 1201 из SEQ ID NO: 6042, или его фрагментов способных образовываться при хотя бы один альфа-спиральный поворот. Предпочтительно, чтобы указанные фрагменты содержали не менее 7 (например, не менее 14, 21, 28, 35, 42, 49 или 56) аминокислота остатки. SEQ ID NO: 7195 включает аминокислоты от 1144 до 1201. А предпочтительный фрагмент HR2 содержит аминокислоты 1144 до 1195 SEQ ID NO: 6042. Этот предпочтительный фрагмент является SEQ ID NO: 7196.

[0226] последовательности пептидов сплавления мембраны внутри протеин шипа также считается, что участвует в слиянии (и заражении) вируса с клетка-хозяин. Пептиды сплавления вообще состоят из около 16 до 26 аминокислот остатки, которые сохраняются в пределах вирусных семей. Эти Мембраны Слияния пептиды относительно гидрофобны и обычно проявляют асимметричность распределение гидрофобитов при моделировании в виде альфа-спирали. Они являются также вообще богатые люди в аланине и глицине.

[0227] по крайней мере три гидрофобных мембранных термоядерных пептидных области имеют были идентифицированы внутри коронавируса (PEP1, PEP2 и PEP3). Смотри, Ло Эт Аль., "Роли в клеточно-клеточном слиянии двух сохраненных гидрофобных областей внутри спайковый белок коронавируса мышей", Вирусология (1998) 244:483-494. ИНЖИР. 1 из этой статьи показывает выравнивание последовательностей пептида сплавления мембраны Вирус гепатита мыши, бычий вирус короны, кошачий заразный Вирус перитонита, вирус трансмиссивного гастроэнтерита и инфекционные заболевания Вирус Бронхита. См. также, Bosch et al., "The Coronavirus Spike Protein представляет собой белок слияния вирусов I класса: структурный и функциональный Характеристика комплекса ядер слияния " журнал вирусологии (2003) 77(16):8801-8811.

[0228] PEP1 (SEQ ID NO: 7197), PEP2 (SEQ ID NO: 7198) и PEP3 (SEQ ID NO: 7199) были определены последовательности внутри протеин шипа SARS.

[0229] спайковые белки коронавируса (и другие подобные поверхностные вирусные протеины) подуманы, что проходят конформационное изменение на приемном устройстве связывание с мембраной клетки-мишени. Один или несколько из гидрофобных Подуманы, что будут подвергнуты действию и введены пептиды сплавления мембраны в целевая мембрана в результате этого конформационного изменения. The free энергия выпущенная на последующий рефолдинг протеина шипа к своему считается, что наиболее стабильная конформация играет определенную роль в слиянии вирусные и клеточные мембраны.

[0230] одна или несколько последовательностей SARS HR, предпочтительно HR2, или фрагмент они могут быть использованы для ингибирования проникновения вирусов и слияния мембран с а цель клетки-хозяина млекопитающего. Изобретение обеспечивает способ ингибирования вирусная инфекция, включающая введение композиции, содержащей один или более компонентов больше SARS HR полипептидов или их фрагментов. Желательно, чтобы композиция содержит последовательность SARS HR2.

[0231] в другом варианте осуществления изобретение включает композицию содержащая последовательность SARS HR1 или ее фрагмент и SARS HR2 последовательность или ее фрагмент. Последовательности HR1 и HR2 могут выборочно быть связаны вместе в олигомер. Состав может включать в себя: промежуточная доменная последовательность между доменами HR1 и HR2. Использование такая промежуточная последовательность может способствовать олигомеризации или другой структурное взаимодействие между регионами HR.

[0232] последовательности HR для использования в изобретении могут быть получены рекомбинантно методами известными в искусстве. Последовательности SARS HR могут быть модифицированный для облегчения экспрессии бактерий. В частности, HR последовательности могут быть доработаны для того чтобы облегчить переход рекомбинантного протеин к поверхности бактериальной клетки хозяина. Например, лидер последовательности к бактериальному протеину мембраны могут быть добавлены к конечной точке Н рекомбинантных последовательностей HR. Последовательности HR для использования в изобретении альтернативно может быть получен химическим синтезом методами, известными в искусство (см. ниже).

[0233] как описано более подробно далее в спецификации, заявители выявлены структурные сходства между спайковым белком SARS а также поверхностный белок Neisseria meningitidis, NadA (и другие аналогичные бактериальные белки адгезии). Еще одно средство облегчения бактериальная экспрессия последовательностей HR включает добавление стебля и / или якорные последовательности NadA-подобного белка К С-концевому участку рекомбинантные последовательности HR. Рекомбинантные последовательности, содержащие бактерию Якорная последовательность предпочтительно может быть приготовлена в везикулах наружной мембраны (подготовка которого более подробно обсуждается далее в разделе приложение). Рекомбинантные последовательности, отсутствующие в бактериальном якоре последовательности могут быть сделаны секретным и выделены из супернатанта.

[0234] изобретение включает полипептидную последовательность, содержащую первую последовательность и вторая последовательность, причем указанная первая последовательность содержит а лидерная последовательность для бактериального мембранного белка и где упомянутый второй последовательность состоит из последовательности HR коронавируса. Желательно, сказал первый последовательность содержит ведущую последовательность для бактериального белка адгезина. Более предпочтительно, чтобы упомянутый бактериальный адгезионный белок был NadA. Предпочтительно сказал: вторая последовательность состоит из HR1, HR2 или обоих. В одном варианте осуществления, во втором последовательность состоит из HR1, HR2 и присутствующей промежуточной доменной последовательности в естественно оссrding протеине шипа. Например, вторая последовательность может состоять из фрагмента спайкового белка коронавируса, содержащего аминокислоты, начинающиеся с N-конца области HR1 и заканчивающиеся с С-концом области HR2.

[0235] изобретение дополнительно включает полипептидную последовательность, содержащую а первая, вторая, третья и четвертая последовательности, где первая последовательность содержит лидерную последовательность для белка бактериальной мембраны; где указанная вторая последовательность содержит HR-последовательность коронавируса; где указанная третья последовательность содержит стеблевой домен бактериальной адгезии белок; и где упомянутая четвертая последовательность содержит якорный домен а бактериальный белок адгезии. В одном варианте осуществления, первая последовательность содержащая лидер пептидная последовательность удаляется. В другом варианте осуществления, третья последовательность, содержащая домен стебля, удаляется. В другом вариант осуществления, четвертая последовательность, содержащая якорный домен, удаляется.

[0236] полипептидные последовательности вышеописанных конструкций могут быть: связаны между собой известными в искусстве средствами, в том числе, например, через глициновые линкеры.

[0237] примеры конструкций, которые могут быть использованы в таких бактериальных системах системы выражений показаны на фиг. 50. Полипептидные последовательности каждого из них конструкции, проиллюстрированные на фиг. 50 даются как SEQ ID NOS: от 7200 до 7206.

[0238] 7200 лидер нада (1-29)--HR1 (879-980)--6. paz. gly--HR2 (1144-1195)--стебель+якорь нада (88-405)

[0239] 7201 лидер нада (1-29)--HR1 (879-980)--6. paz. gly--HR2 (1144-1196)--stalk NadA (88-351)

[0240] 7202 лидер нада (1-29)--HR1--HR2 (879-1196)--стебель+якорь нада (88-405)

[0241] 7203 лидер нада (1-29)--HR1--HR2 (879-1196)--стебель нада (88-351)

[0242] 7204 HR1--HR2 (879-1196)--stalk NadA (88-351)-6.паз. ero

[0243] 7205 лидер нада (1-29)--HR1--HR2 (879-1196) - якорь нада (351-405)

[0244] 7206 лидер нада (1-29)--HR1--HR2 (879-1196)

[0245] введение еще одной из этих последовательностей слияния мембран может также препятствовать способности коронавируса слиться с хозяином клеточная мембрана. Соответственно, изобретение включает в себя изолированную полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы состоящей из SEQ ID NO: 7197, SEQ ID NO: 7198 и SEQ ID NO: 7199. То изобретение дополнительно включает выделенный полипептид, содержащий аминокислотная последовательность, имеющая гомологию последовательности к выбранной аминокислотной последовательности из группы, состоящей из SEQ ID NO: 7197, SEQ ID NO: 7198 и SEQ ID Нет: 7199.

[0246] два или более из этих пептидов сплавливания мембраны SARS можно совместить вместе. Изобретение включает композицию, содержащую два Торп Мембранные термоядерные пептиды, в которых указанные пептиды выбраны по меньшей мере из одного набора две аминокислоты, выбранные из группы, состоящей из SEQ ID NO: 7197, SEQ ID NO: 7198 и SEQ ID NO: 7199, или последовательность, имеющая последовательность тождественность этому.

[0247] могут быть связаны два или более пептидов слияния мембран SARS вместе. Соответственно, изобретение включает полипептид, содержащий а первая аминокислотная последовательность и вторая аминокислотная последовательность, где упомянуты: первая и вторая аминокислотные последовательности выбираются из группы состоящий из SEQ ID NO: 7197, SEQ ID NO: 7198 и SEQ ID NO: 7199, или а последовательность, имеющая к ней идентичность последовательности. Предпочтительно, сказал первый аминокислотная последовательность и упомянутая вторая аминокислотная последовательность отличаются от SARS Пептиды сплавливания мембраны, т. е., они нет этих же.

[0248] изобретение также включает способ лечения или профилактики Вирусная инфекция торс, включающая введение одного или нескольких из них Композиции пептида сплавливания мембраны описанные выше.

[0249] как обсуждалось выше, спайковый белок способен образовываться тримерс. Изобретение дополнительно включает полипептид, содержащий SEQ ID Нет: 6042 в тримерической форме. Изобретение включает композицию содержащего не менее полипептидов, где каждый полипептид содержит по крайней мере, Альфа-спиральная спиральная область спайкового белка вируса атипичной пневмонии. Предпочтительно, чтобы спайковый белок содержал SEQ ID NO: 6042 или фрагмент из этого.

[0250] изобретение дополнительно включает композицию, содержащую торс вирусный спайковый белок или его фрагмент, где указанный белок является связанный с трансмембраной и в котором указанный фрагмент содержит Альфа-спиральная область спайкового белка вируса ОРВИ. Желательно, чтобы композиция содержит по меньшей мере три спайковых белка вируса ОРВИ или а фрагмент его, причем фрагмент содержит альфа-спиральную область из Спайка белка вируса ОРВИ.

[0251] изобретение дополнительно включает антитело, которое специфически связывается с тримерной формой спайковых белков вируса ОРВИ. Желательно, чтобы спайковый белок содержит SEQ ID NO: 6042 или его фрагмент. То изобретение включает антитело, которое специфически связывается с тримером форма спайковых белков вируса ОРВИ, в которой эти белки ассоциированы с помощью трансмембраны.

[0252] изобретение дополнительно включает антитело, которое специфически связывается с мономерной формой вируса ОРВИ спайковый белок или фрагмент из этого. Предпочтительно, антитело специфически связывается с мономерной формой SEQ ID NO: 6042 или его фрагмент.

[0253] изобретение дополнительно включает в себя небольшую молекулу, которая интерферирует С или нарушает свертываться спиралью trimer протеина шипа SARS вирусного.

[0254] изобретение дополнительно включает аттенуированный вирус SARS для использования в качестве вакцина, в которой указанный аттенуированный вирус содержит полинуклеотид вставка, удаление или подстановка, которая не нарушает тримерическую последовательность конформация спайкового белка вируса ОРВИ. Изобретение далее включает аттенуированный вирус SARS для использования в качестве вакцины, где указано аттенуированный вирус содержит полинуклеотидную вставку, удаление или замещение которое не нарушает Альфа-спиральное образование Спайковый белок вируса ОРВИ.

[0255] спайковый белок может быть рекомбинантно получен. Одновременно воплощение, белок шипа выражен в вирусе как частицы так что этот белок прикреплен к клеточной мембране. Такое приложение может облегчают представление иммуногенных эпитопов спайкового белка. Предпочтительно, Альфа-спиральная часть спайкового белка ассоциирована с клеточной мембраной. Предпочтительно спайковые белки образуют тример в пределах трансмембранной области прикрепления.

[0256] определены прогнозируемые участки N-гликозилирования SEQ ID NO: 6042 ниже: ТАБЛИЦА-США-00008 Jury NGLyc Позиция потенциальный результат соглашения 29 NYTQ SEQ ID NO: 7207 0.7751 (9/9) +++ 65 NVTG SEQ ID NO: 7208 0.8090 (9/9) +++ 109 NKSQ SEQ ID NO: 7209 0.6081 (7/9) + 119 NSTN SEQ ID NO: 7210 0.7039 (9/9) ++ 158 NCTF SEQ ID NO: 7211 0.5808 (7/9) + 227 NITN SEQ ID NO: 7212 0.7518 (9/9) +++ 269 NGTI SEQ ID NO: 7213 0.6910 (9/9) ++ 318 NITN SEQ ID NO: 7214 0.6414 (9/9) ++ 330 NATK SEQ ID NO: 7215 0.6063 (8/9) + 357 NSTF SEQ ID NO: 7216 0.5746 (8/9) + 589 NASS SEQ ID NO: 7217 0.5778 (6/9) + 602 NCTD SEQ ID NO: 7218 0.6882 (9/9) ++ 699 NFSI SEQ ID NO: 7219 0.5357 (7/9) + 783 NFSQ SEQ ID NO: 7220 0.6348 (9/9) ++ 1080 NGTS SEQ ID NO: 7221 0.5806 (7/9) + 1116 NNTV SEQ ID NO: 7222 0.5106 (5/9) + 1176 NESL SEQ ID NO: 7223 0.6796 (9/9) ++

[0257] соответственно, изобретение включает полипептид, содержащий а фрагмент SEQ ID NO: 6042, где указанный фрагмент содержит один или несколько элементов из мест гликозилирования, указанных выше (SEQ ID NOS: 7207-7223). То изобретение дополнительно включает в себя полинуклеотид, кодирующий один или несколько из следующих компонентов: фрагменты, идентифицированные выше. Этот сайт гликозилирования может быть ковалентно присоединяется к сахариду. Соответственно, изобретение включает в себя полипептид, содержащий фрагмент SEQ ID NO: 6042, где указанный фрагмент содержит один или несколько из выявленных участков гликозилирования вышесказанное и где указанный полипептид гликозилирован в одном или нескольких из следующих полипептидов: сайты, указанные выше.

[0258] ниже указаны прогнозируемые участки о-гликозилирования: ТАБЛИЦА-США-00009 Остаток Нет. Назначение Потенциального Порога Thr 698 0.8922 0.7696 T Thr 706 0.9598 0.7870 T Thr 922 0.9141 0.7338 T Ser 36 0.8906 0.7264 S Ser 703 0.8412 0.7676 S

[0259] изобретение включает полипептид, содержащий фрагмент SEQ ID NO: 6042 где указанный фрагмент содержит один или несколько из следующих фрагментов: Сайты о-гликозилирования, указанные выше. Изобретение дополнительно включает в себя полинуклеотид, кодирующий один или несколько из указанных выше фрагментов. Изобретение дополнительно включает полипептид, содержащий фрагмент SEQ ID NO: 6042 где указанный фрагмент содержит один или несколько из следующих фрагментов: О-участки гликозилирования, идентифицированные выше и далее, где полипептид ковалентно скреплен к сахариду на одном или больше из включены участки гликозилирования.

[0260] изобретение дополнительно включает полипептид, содержащий фрагмент из SEQ ID NO: 6042 где указанный фрагмент содержит один или несколько из следующих фрагментов: N-гликозилирующие сайты, идентифицированные выше и далее, где указанный фрагмент содержит один или несколько из указанных выше участков о-гликозилирования.

[0261] изобретение включает полипептид, содержащий фрагмент SEQ ID нет: 6042 где указанный фрагмент не включает в себя один или несколько из следующих фрагментов: сайты гликозилирования определены выше. Изобретение также включает в себя полинуклеотид, кодирующий такой полипептид.

[0262] прогнозируемые места фосфорилирования SEQ ID NO: 6042 являются Ser-346, Tyr-195 и Tyr-723. Соответственно, изобретение содержит полипептид содержащий фрагмент SEQ ID NO: 6042 где указанный фрагмент содержит по меньшей мере десять аминокислотных остатков и где указанный фрагмент содержит один или более аминокислот, выбранных из группы, состоящей из Ser-346, Tyr-195 и Tyr-723. В одном варианте осуществления одна или несколько аминокислот выбранные из группы, состоящей из Ser-346, Tyr-195 и Tyr-723 являются фосфорилированными.

[0263] выражение и функциональная характеристика шипа гликопротеин был описан Xiao et al. (2003) Biochem Biophys Res Comm 312: 1159-1164.

[0264] Т-эпитопы для SEQ ID NO: 6042 идентифицированы в таблице 16. То изобретение включает в себя полипептид для использования в качестве антигена, причем полипептид содержит: (a) аминокислотную последовательность, выбранную из группы состоящий из последовательностей Т-эпитопа, идентифицированных как SEQ ID NOS: 8041-8280; (b) аминокислотная последовательность, имеющая тождественность последовательности к аминокислотная последовательность (a). Изобретение дополнительно содержит а полинуклеотидная последовательность, кодирующая полипептиды (a) или (b). То изобретение дополнительно содержит способ выражения или доставки такого выражения полинуклеотиды через вирусные векторы и / или вирусные частицы. То изобретение дополнительно содержит полипептид, содержащий два или более из следующих компонентов: Т-эпитопные последовательности, идентифицированные в SEQ ID NOS: 8041-8280, или а полинуклеотид, кодирующий такой полипептид.

[0265] использование в качестве антигена предпочтительно использовать: (1) в качестве Т-клетки антиген; (2) для генерирования комплекса между белком МНС класса I (например а class I HLA) и фрагмент указанного антигена; (3) в качестве антигена для повышение клеточно-опосредованного иммунного ответа; и / или (4) в качестве антигена для повышение ответа CTL. Польза предпочтительно защищает или обрабатывает заболевание и / или инфекция, вызванная вирусом SARS. Изобретение обеспечивает применение полипептида в производстве лекарственного средства для иммунизации а млекопитающее (типично человек) против инфекции SARS вирусной где полипептид как определено выше.

[0266] в изобретении предложен способ повышения иммунного ответа у человека в условиях искусственного кровообращения. млекопитающее (как правило, человек), включающее в себя этап введения в организм млекопитающее а полипептид, как определено выше, где указанный иммунный ответ представляет собой клеточно-опосредованный иммунный ответ и, предпочтительно, реакция CTL. Иммунная система ответ является предпочтительно защитным или терапевтическим.

[0267] изобретение включает полипептид, содержащий SEQ ID NO: 6040. Изобретение включает полипептид, содержащий аминокислотную последовательность имея идентификатор последовательности для SEQ ID NO: 6040. Изобретение включает в себя: фрагмент полипептида, содержащего SEQ ID NO: 6040. Изобретение включает полинуклеотид, кодирующий SEQ ID NO: 6040, или его фрагмент. Изобретение включает диагностический набор, содержащий полипептид содержащий SEQ ID NO: 6040 или его фрагмент. Изобретение включает в себя: диагностический набор, содержащий полинуклеотидную последовательность, кодирующую SEQ ID NO: 6040 или его фрагмент. Изобретение включает антитело, которое распознает полипептид, содержащий SEQ ID NO: 6040 или фрагмент из этого.

[0268] SEQ ID NO: 6040 демонстрирует функциональную гомологию с мембраной белок коронавируса. Прогнозируемые трансмембранные спирали SEQ ID нет: 6040 идентифицированы ниже:

Предсказанные Трансмембранные Спирали

[0269] позиции последовательности в скобках обозначают основную область.

[0270] значимыми считаются только баллы выше 500. ТАБЛИЦА-США-00010 от к центру счета Внутри в внешним спиралям: 3 найдено 27 (30) 48 (45) 1138 38 137 (139) 153 (153) 486 146 Снаружи внутрь спирали: 3 найдено 28 (31) 45 (45) 819 38 71 (73) 90 (90) 210 81 136 (142) 156 (156) 272 149

[0271] аминокислотная область с наибольшей прогнозируемой трансмембраной спиральная область находится в положении аминокислоты от 27 до 48 SEQ ID NO: 6040. Такие трансмембранные области часто трудно выразить рекомбинантно. Соответственно, изобретение включает полипептид, содержащий фрагмент SEQ ID NO: 6040, где указанный фрагмент не включает аминокислоту последовательность между позициями 27-48. Изобретение включает полипептид содержащий фрагмент SEQ ID NO: 6040, где указанный фрагмент не имеет значения включите последовательность аминокислоты между положениями 28 до 45. Изобретение также включает в себя полинуклеотидную последовательность, кодирующую любой из над-определенные полипептиды.

[0272] SEQ ID NO: предсказано, что 6040 будет гипотетическим протеином вирус SARS. Прогноз локализации белка SEQ ID NO: 6040 изложено ниже. SEQ ID NO: 6040, как ожидается, будет расположен в одном из следующие положения: митохондриальное пространство матрицы, микробное тело (пероксисома), ядро и митохондриальная внутренняя мембрана. SEQ ID NO: 6040 предсказано, что он будет связан с органеллой внутри инфицированной клетки.

[0273] соответственно, SEQ ID NO: 6040 является мишенью для скрининга химических веществ ингибиторы вируса ОРВИ. Изобретение включает полипептид содержит SEQ ID NO: 6040 или его фрагмент. Изобретение включает в себя: полинуклеотид, кодирующий полипептидную последовательность SEQ ID NO: 6040 или а фрагмент его. Изобретение включает способ экранирования SEQ ID NO: 6040 для ингибитора. Изобретение включает рекомбинантную экспрессию SEQ ID NO: 6040 в основной ячейке. Изобретение включает в себя небольшой молекула которая предотвращает полипептид SEQ ID нет: 6040 от ассоциируется с органеллой внутри зараженной клетки. Изобретение включает в себя белок слияния, где указанный белок слияния содержит SEQ ID Нет: 6040. ТАБЛИЦА-США-00011 PSORT - - - прогнозирование участков локализации белка версия 6.4 (WWW) SEQ ID NO: 6040 163 остатки Классификация видов: 4 *** Шаг Рассуждения: 1 Предварительный расчет ALOM (порог: 0.5) количество: 0 McG: изучение последовательности сигналов (McGeoch) Длина UR: 9 Пиковое значение UR: 1.75 Чистый заряд CR: 1 Дискриминантный Балл: -2.56 GvH: изучение последовательности сигналов (von Heijne) Оценка Сигнала (-3.5): 1.94 Возможное место расщепления: 53 > > > > > Похоже, что нет N-концевого сигнала seq. Аминокислотный состав прогнозируемой зрелой формы: рассчитано от 1 ALOM new cnt: 0 * * thrshld изменен на -2 Расщепляемый сигнал был обнаружен в ALOM?: 0B ALOM: поиск трансмембранных областей (Klein et al.) количество: 0 значение: 1.32 порог: -2.0 Периферийное правдоподобие = 1,32 модифицированный балл ALOM: -1.16 Молоток: изучение границы митохондриального таргетинга seq. мотив по адресу: 156 HRSVTI Дискриминация митохондриальной мишени seq.: notclr (0.88) Правило: митохондриальный белок Правило: митохондриальный белок Правило: митохондриальный белок Правило: митохондриальный белок *** Шаг Рассуждения: 2 Количество KDEL: 0 Контроль аполярного сигнала для внутримитохондриальной сортировки (Положение молотка 156) от: 27 до: 44 оценка: 5,0 Митохондриальный матрикс? Оценка: 0.36 СКЛ-мотив (сигнал для пероксисомного белка): pos: 99(163), количество: 1 SKL Оценка СКЛ (пероксисом): 0,3 Тенденция состава аминокислоты для пероксисомы: -4.28 Пероксисомные белки? Статус: notclr Тенденция аминокислотного состава для лизосомальных белков оценка: 0.02 статус: notclr Модифицированная оценка для лизосомы: 0.152 Проверка количества основных остатков (ядра) Проверка схемы остатков 4 для ядерного целеуказания Найдено: pos: 132 (5) KRKR Проверка схемы остатков 7 для ядерного целеуказания Проверка консенсуса Robbins & Dingwall (ядро) Проверка мотива связывания РНК (ядро или цитоплазма) НУК видоизменен. Оценка: 0.60 Состояние ядерного сигнала: notclr (0.30) Проверка мотива СааХ.. Проверка N-миристоилирования.. Проверка мотива СааХ.. ----- окончательный результат ----- пространство митохондриальной матрицы - - - определенность = 0,480 (утвердительно) <succ> микробное тело (пероксисома) - - - определенность = 0,300 (утвердительно) <succ> ядро-определенность = 0,300 (утвердительно) <succ> внутренняя мембрана митохондрий - - - определенность = 0,188 (утвердительно) <succ>

[0274] определены прогнозируемые участки N-гликозилирования SEQ ID NO: 6040 ниже. ТАБЛИЦА-США-00012 Jury NGLyc Позиция потенциальный результат соглашения 2 NKTG (SEQ ID HET: 7255) 0.7804 (9/9) +++ 106 NLTL (SEQ ID NO: 7256) 0.6123 (7/9) +

[0275] соответственно изобретение содержит фрагмент SEQ ID NO: 6040 в котором указанный фрагмент не менее десяти аминокислот, отличающийся тем, что фрагмент содержит один или несколько аспарагинов из аминокислоты позиции SEQ ID NO: 6040, выбранные из группы, состоящей из 2 и 106. Изобретение включает фрагмент SEQ ID NO: 6040, в котором указано: фрагмент содержит одну или несколько аминокислотных последовательностей, выбранных из группа, состоящая из SEQ ID NO: 7255 и SEQ ID NO: 7256. Желательно, чтобы фрагмент содержит аминокислотную последовательность NKTG (SEQ ID NO: 7255).

[0276] изобретение включает полипептид, содержащий фрагмент SEQ ID NO: 6040 где указанный фрагмент не включает в себя один или несколько из следующих фрагментов: сайты гликозилирования определены выше. Изобретение также включает в себя полинуклеотид, кодирующий такой полипептид.

[0277] Т-эпитопы для SEQ ID NO: 6040 идентифицированы в таблице 14. То изобретение включает в себя полипептид для использования в качестве антигена, причем полипептид содержит: (а) аминокислотную последовательность, выбранную из группы состоящий из последовательностей Т-эпитопа, идентифицированных в SEQ ID NOS: 7640-7800; (b) аминокислотная последовательность, имеющая тождественность последовательности к аминокислотная последовательность (а). Изобретение дополнительно содержит а полинуклеотидная последовательность, кодирующая полипептиды (а) или (b). То изобретение дополнительно содержит способ выражения или доставки такого выражения полинуклеотиды через вирусные векторы и / или вирусные частицы. То изобретение дополнительно содержит полипептид, содержащий два или более из следующих компонентов: Т-эпитопные последовательности, идентифицированные в SEQ ID NOS: 7640-7800, или а полинуклеотид, кодирующий такой полипептид.

[0278] использование в качестве антигена предпочтительно использовать: (1) в качестве Т-клетки антиген; (2) для генерирования комплекса между белком МНС класса I (например а class I HLA) и фрагмент указанного антигена; (3) в качестве антигена для повышение клеточно-опосредованного иммунного ответа; и / или (4) в качестве антигена для повышение ответа CTL. Польза предпочтительно защищает или обрабатывает заболевание и / или инфекция, вызванная вирусом SARS.

[0279] изобретение предусматривает применение полипептида в производстве лекарственного средства для иммунизации млекопитающего (обычно человека) против ОРВИ вирусная инфекция где полипептид как определено выше.

[0280] в изобретении предложен способ повышения иммунного ответа у человека, получающего инсулин. млекопитающее (как правило, человек), включающее в себя этап введения в организм млекопитающее а полипептид, как определено выше, где указанный иммунный ответ представляет собой клеточно-опосредованный иммунный ответ и, предпочтительно, реакция CTL. Иммунная система ответ является предпочтительно защитным или терапевтическим.

[0281] изобретение включает полипептид, содержащий SEQ ID NO: 6041. SEQ ID NO: 6041 демонстрирует функциональные гомологии с частью ORF 1ab полипротеин. Изобретение включает полипептид, содержащий аминокислотная последовательность, имеющая идентификатор последовательности для SEQ ID NO: 6041. Изобретение включает фрагмент полипептида, содержащего SEQ ID NO: 6041. То изобретение включает полинуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислоту последовательность, имеющая идентификатор последовательности для SEQ ID NO: 6041. Изобретение включает в себя полинуклеотид, кодирующий фрагмент полипептида, содержащего SEQ ID NO: 6041.

[0282] изобретение включает диагностический набор, содержащий полипептид состоит из SEQ ID NO: 6041 или фрагмента thereof. Изобретение включает в себя: диагностический набор, содержащий полинуклеотид, кодирующий SEQ ID NO: 6041 или а фрагмент его. Изобретение включает иммуногенную композицию содержащий полипептид, содержащий SEQ ID NO: 6041 или фрагмент из этого. Изобретение включает антитело, которое распознает а полипептид, содержащий SEQ ID NO: 6041 или его фрагмент.

[0283] полипротеины коронавируса связаны с ферментативными Активность. Соответственно, SEQ ID NO: 6041 является мишенью для скрининга химические ингибиторы вируса ОРВИ. Изобретение включает в себя: полипептид, содержащий SEQ ID NO: 6041 или его фрагмент. То изобретение включает в себя полинуклеотид, кодирующий полипептидную последовательность SEQ ID NO: 6041 или его фрагмент. Изобретение включает в себя способ получения экранирование SEQ ID NO: 6041 для ингибитора. Изобретение включает в себя: рекомбинантная экспрессия SEQ ID NO: 6041 в клетке-хозяине. Изобретение включает в себя небольшую молекулу, которая предотвращает полипептид SEQ ID NO: 6041 от выполнения ферментативной активности. Изобретение включает в себя сплавление белок, в котором указанный белок слияния содержит SEQ ID NO: 6041.

[0284] прогнозируемые трансмембранные или гидрофобные области SEQ ID NO: 6041 указаны ниже. Хотя полипротеин коронавируса есть протеолитически расщепляется на множество более мелких белков, гидрофобных домены в полипротеине известны, что посредничают ассоциацию мембраны тиражирования комплекса и иметь возможность кардинально изменить архитектура мембран клеток-хозяев. Соответственно, гидрофобные Домены полипротеина являются мишенями для генетической мутации, чтобы развиваться ослабленные Вакцины против вируса ОРВИ. Гидрофобные Домены также являются мишенями для небольших объектов молекулы ингибиторов вируса ОРВИ. Гидрофобные домены могут также быть использовано для того чтобы произвести антитела специфические к тем зонам для того чтобы обработать или предотвратить заражение вирусом SARS.

Возможные трансмембранные спирали SEQ ID NO: 6041

[0285] позиции последовательности в скобках обозначают основную область.

[0286] значимыми считаются только баллы выше 500. ТАБЛИЦА-США-00013 от к центру счета Внутри и снаружи спирали: найдено 18 234 (234) 254 (250) 1046 241 256 (256) 272 (270) 252 263 319 (319) 334 (334) 227 327 503 (505) 522 (519) 405 512 613 (615) 633 (629) 619 622 677 (679) 703 (696) 467 689 849 (851) 869 (865) 229 858 1080 (1080) 1097 (1094) 306 1087 1147 (1149) 1163 (1163) 354 1156 1557 (1557) 1581 (1577) 817 1567 1954 (1954) 1971 (1971) 832 1964 2369 (2372) 2395 (2387) 300 2379 2513 (2513) 2532 (2529) 690 2522 Снаружи-внутри спирали: найдено 14 239 (239) 254 (254) 924 247 239 (248) 272 (263) 468 256 311 (314) 334 (328) 267 321 499 (503) 522 (519) 485 512 617 (617) 634 (631) 425 624 849 (853) 872 (872) 572 864 1147 (1147) 1162 (1162) 765 1155 1564 (1564) 1581 (1579) 883 1572 1951 (1951) 1968 (1966) 657 1958 2513 (2522) 2539 (2537) 711 2529

[0287] соответственно, изобретение включает полипептид, содержащий а фрагмент SEQ ID NO: 6041, где указанный фрагмент содержит аминокислотная последовательность, включающая одну или более гидрофобных трансмембран последовательности, указанные выше. Изобретение включает полипептид содержащий фрагмент SEQ ID NO: 6041, в котором указанный фрагмент содержит одна или несколько из следующих полипептидных последовательностей SEQ ID NO: 6041: 234-254, 613-633, 1557-1581, 1954-1971, 2513-2532, 239-254, 1564-1581, 1951-1968, 2513-2539. Предпочтительно, чтобы фрагмент содержал один или несколько из следующие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 6041: 234-254 и 239-254. Изобретение также включает в себя полинуклеотиды, кодирующие каждый из полипептидных фрагменты идентифицированы выше.

[0288] изобретение включает аттенуированный вирус SARS, в котором указанный вирус является аттенуированным вирусом атеросклероза. аттенуированный вирус ОРВИ содержит добавление, удаление или замену в полинуклеотиды, кодирующие один из гидрофобных доменов указанный выше. Изобретение также включает в себя способ создания аттенуированный вирус ОРВИ, содержащий мутацию вируса ОРВИ путем добавления, удаление или замена вирусного генома вируса атипичной пневмонии для изменения кодирование одного или нескольких гидрофобных доменов SEQ ID NO: 6041 указанный выше.

[0289] изобретение включает антитело, которое специфически идентифицирует одна или несколько гидрофобных областей SEQ ID NO: 6041 идентифицировано выше. Изобретение включает в себя небольшую молекулу, которая связывается, интерферирует с hydrophobicity или в противном случае нарушает одно или больше из гидрофобные области SEQ ID NO: 6041 идентифицированы выше.

[0290] определены прогнозируемые участки N-гликозилирования SEQ ID NO: 6041 ниже: ТАБЛИЦА-США-00014 Jury NGlyc Позиция потенциальный результат соглашения 571 NLSH (SEQ ID NO: 7257) 0.6598 (8/9) + 835 NTSR (SEQ ID NO: 7258) 0.5762 (7/9) + 958 NVTD (SEQ ID NO: 7259) 0.7494 (9/9) ++ 1113 NISD (SEQ ID NO: 7260) 0.7259 (8/9) + 1205 NSTL (SEQ ID NO: 7261) 0.6296 (9/9) ++ 1460 NVTG (SEQ ID NO: 7262) 0.6844 (9/9) ++ 1685 NHSV (SEQ ID NO: 7263) 0.5181 (5/9) + 2029 NKTT (SEQ ID NO: 7264) 0.5423 (5/9) +

[0291] соответственно изобретение включает полипептид, содержащий а фрагмент аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 6041, где указано фрагмент содержит один или более из выявленных участков N-гликозилирования выше. Изобретение содержит полипептид, содержащий фрагмент SEQ ID NO: 6041 где указанный фрагмент содержит одну или несколько последовательностей SEQ ИДЕНТИФИКАЦИОННЫЙ НОМЕР: 7257-7264. Предпочтительно, чтобы фрагмент содержал один или несколько из следующих элементов: последовательности SEQ ID NOS: 7257, 7259, 7260, 7261 и

7262. Изобретение дополнительно содержит полинуклеотид, кодирующий один или несколько из следующих компонентов: полипептиды идентифицированы выше.

[0292] изобретение включает полипептид, содержащий фрагмент SEQ ID NO: 6041 где указанный фрагмент не включает в себя один или несколько из следующих фрагментов: сайты гликозилирования определены выше. Изобретение также включает в себя полинуклеотид, кодирующий такой полипептид.

[0293] т-эпитопы для SEQ ID NO: 6041 идентифицированы в таблице 15. То изобретение включает в себя полипептид для использования в качестве антигена, причем полипептид содержит: (а) аминокислотную последовательность, выбранную из группы состоящей из последовательностей Т-эпитопа, идентифицированных в SEQ ID NOS: 7801-8040; (b) аминокислотная последовательность, имеющая тождественность к аминокислотная последовательность (а). Изобретение дополнительно содержит а полинуклеотидная последовательность, кодирующая полипептиды (а) или (b). То изобретение дополнительно содержит способ выражения или доставки такого выражения полинуклеотида через вирусные векторы и / или вирусные частицы. То изобретение дополнительно содержит полипептид, содержащий два или более из следующих компонентов: Т-эпитопные последовательности, идентифицированные в SEQ ID NOS: 7801-8040, или а полинуклеотид, кодирующий такой полипептид.

[0294] использование в качестве антигена предпочтительно использовать: (1) в качестве Т-клетки антиген; (2) для генерирования комплекса между белком МНС класса I (например а class I HLA) и фрагмент указанного антигена; (3) в качестве антигена для повышение клеточно-опосредованного иммунного ответа; и / или (4) в качестве антигена для повышение ответа CTL. Польза предпочтительно защищает или обрабатывает заболевание и / или инфекция, вызванная вирусом SARS.

[0295] изобретение предусматривает применение полипептида в производстве лекарственного средства для иммунизации млекопитающего (обычно человека) против ОРВИ вирусная инфекция где полипептид как определено выше.

[0296] в изобретении предложен способ повышения иммунного ответа у человека в условиях искусственного кровообращения. млекопитающее (как правило, человек), включающее в себя этап введения в организм млекопитающее а полипептид, как определено выше, где указанный иммунный ответ представляет собой клеточно-опосредованный иммунный ответ и, предпочтительно, реакция CTL. Иммунная система ответ является предпочтительно защитным или терапевтическим.

[0297] изобретение включает полипептидную последовательность SEQ ID NO: 6043 или а фрагмент его. Изобретение включает полипептид, содержащий аминокислотная последовательность, имеющая идентичность последовательности SEQ ID NO: 6043. То изобретение включает полинуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6043 или ее фрагмент.

[0298] предсказанные трансмембранные области SEQ ID NO: 6043 приведены ниже. ТАБЛИЦА-США-00015 от к центру счета Внутри к внешним спиралам: 4 найдено 41 (41) 56 (56) 1789 49 76 (79) 99 (99) 2142 89 105 (105) 125 (125) 1250 115 Снаружи внутрь спирали: 3 найдено 41 (41) 59 (56) 2053 49 76 (82) 98 (96) 1580 89 103 (105) 125 (123) 1257 115

[0299] аминокислотная область с наибольшей прогнозируемой трансмембраной спиральная область находится от аминокислотного положения 76 до 99 SEQ ID NO: 6043. Такие трансмембранные области часто трудно выразить рекомбинантно. Соответственно, изобретение включает полипептид, содержащий фрагмент SEQ ID NO: 6043 где указанный фрагмент не включает в себя один или несколько из гидрофобные аминокислотные последовательности идентифицированы выше. Желательно, чтобы фрагмент не включает аминокислоты между позициями 27-48. То изобретение также включает в себя полинуклеотидную последовательность, кодирующую любой из над-определенные полипептиды.

[0300] SEQ ID NO: предсказано, что 6043 будет гипотетическим протеином вирус SARS. Прогноз локализации белка SEQ ID NO: 6043 изложено ниже. SEQ ID NO: 6043, как ожидается, будет расположен в одном из следующие положения: митохондриальная внутренняя мембрана, плазматическая мембрана, Тело Гольджи и митохондриальное межмембранное пространство. SEQ ID NO: 6043 может быть ассоциируется с органеллой внутри зараженной клетки.

[0301] соответственно, SEQ ID NO: 6043 является мишенью для скрининга химических веществ ингибиторы вируса ОРВИ. Изобретение включает полипептид содержит SEQ ID NO: 6043 или его фрагмент. Изобретение включает в себя: полинуклеотид, кодирующий полипептидную последовательность SEQ ID NO: 6043 или а фрагмент его. Изобретение включает способ экранирования SEQ ID NO: 6043 для ингибитора. Изобретение включает рекомбинантную экспрессию из SEQ ID NO: 6043 в основной ячейке. Изобретение включает в себя небольшой молекула которая предотвращает полипептид SEQ ID нет: 6043 от ассоциируется с органеллой внутри зараженной клетки. Изобретение включает в себя белок слияния, где указанный белок слияния содержит SEQ ID Нет: 6043. ТАБЛИЦА-США-00016 PSORT - - - прогнозирование сайтов локализации белка для SEQ ID NO: 6043 версия 6.4 (WWW) Классификация видов: 4 *** Шаг Рассуждения: 1 Предварительный расчет ALOM (порог: 0.5) количество: 3 Положение самого N-образного терминала TMS: 40 при i = 2 MTOP: топология мембраны (Hartmann et al.) И (средний): 47 дифференс обязанности (K-H): 3.5 McG: изучение последовательности сигналов (McGeoch) Длина UR: 12 Пиковое значение UR: 1.41 Чистый заряд CR: 0 Дискриминантный Балл: -4.67 GvH: изучение последовательности сигналов (von Heijne) Оценка Сигнала (-3.5): 3.44 Возможное место расщепления: 15 > > > > > Похоже, что нет N-концевого сигнала seq. Аминокислотный состав прогнозируемой зрелой формы: рассчитано от 1 ALOM new cnt: 2 * * thrsld изменен на -2 Расщепляемый сигнал был обнаружен в ALOM?: 0B ALOM: поиск трансмембранных областей (Klein et al.) количество: 2 Значение: -6.90 порог: -2.0 Интегральное правдоподобие = -6.90 Трансмембрана 83-99 (78-101) Интегральное правдоподобие = -5.04 Трансмембрана 40-56 (37-60) Периферийное правдоподобие = -0.32 модифицированный балл ALOM: 1.48 > > > > > Вероятно мембранный белок типа IIIb (Nexo Ссут) Молоток: изучение границы митохондриального таргетинга seq. мотив по адресу: 128 MRCWLC Дискриминация митохондриальной мишени seq.: notClr (0.76) Правило: митохондриальный белок Правило: митохондриальный белок Правило: митохондриальный белок Правило: митохондриальный белок *** Шаг Рассуждения: 2 Тип IIIa или IIIb благовоит к для ER memb. белковая пицца Количество KDEL: 0 Контроль аполярного сигнала для внутримитохондриальной сортировки (Позиция 128 молотка) от: 39 до: 56 оценка: 11.5 > > > > > Похоже, что у него есть внутримитохондриальный сигнал Митохондриальная внутренняя мембрана? Оценка: 0.59 Митохондриальный интермембран.- в космос? Счет: 0.22 СКЛ-мотив (сигнал для пероксисомного белка): поз: 92(274), кол-во: 1 ШЛ Оценка СКЛ (пероксисом): 0,3 Тенденция состава аминокислоты для пероксисомы: 4.78 Пероксисомные белки? Статус: положительный Тенденция аминокислотного состава для лизосомальных белков оценка: 1.16 статус: notClr Белки III типа могут локализоваться в Гольджи Проверка количества основных остатков (ядра) Проверка схемы остатков 4 для ядерного целеуказания Проверка схемы остатков 7 для ядерного целеуказания Проверка консенсуса Robbins & Dingwall (ядро) Проверка мотива связывания РНК (ядро или цитоплазма) Состояние ядерного сигнала: отрицательный (0.00) Проверьте количество TMSs для typeIII (plasma memb.) Проверка N-миристоилирования.. ---- окончательный результат ---- митохондриальная внутренняя мембрана - - - определенность = 0,664 (утвердительно) <succ> плазматическая мембрана - - - определенность = 0,600 (утвердительный ответ) <succ> Тело Гольджи - - - определенность = 0,400 (утвердительно) <succ> митохондриальное межмембранное пространство - - - определенность = 0,362 (утвердительно) <succ>

[0302] предсказанные N-и о-гликозилирования сайты SEQ ID NO: 6043 являются определены ниже. ТАБЛИЦА-США-00017 Jury NGlyc Позиция потенциальный результат соглашения 227 NATF (SEQ ID NO: 7265) 0.6328 (7/9) + Остаток Нет. Назначение Потенциального Порога Thr 28 0.9095 0.6280 T Thr 32 0.8740 0.6595 T Thr 34 0.9058 0.6655 T Thr 170 0.6816 0.6600 T Thr 267 0.9240 0.5779 T Thr 268 0.7313 0.5708 T Thr 269 0.9859 0.5583 T Thr 270 0.8023 0.5492 T Ser 27 0.6930 0.6091 S Ser 252 0.6457 0.5977 S

[0303] соответственно изобретение содержит полипептид, содержащий а фрагмент аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 6043, где указано фрагмент содержит сайты N-гликозилирования или О-гликозилирования указанный выше. Изобретение содержит полипептид, содержащий а фрагмент SEQ ID NO: 6043, где указанный фрагмент содержит один или несколько элементов из N-гликозилирующих участков или о-гликозилирующих участков, указанных выше. Изобретение дополнительно содержит полинуклеотид, кодирующий один или несколько из полипептиды идентифицированы выше.

[0304] изобретение включает полипептид, содержащий фрагмент SEQ ID нет: 6043 где указанный фрагмент не включает в себя один или несколько из следующих фрагментов: сайты гликозилирования определены выше. Изобретение также включает в себя полинуклеотид, кодирующий такой полипептид.

[0305] Т-эпитопы для SEQ ID NO: 6043 идентифицированы в таблице 17. То изобретение включает в себя полипептид для использования в качестве антигена, причем полипептид содержит: (а) аминокислотную последовательность, выбранную из группы состоящий из последовательностей Т-эпитопа, идентифицированных в SEQ ID NOS: 8281-8486; (b) аминокислотная последовательность, имеющая тождество последовательности с Ан аминокислотная последовательность (а). Изобретение дополнительно содержит а полинуклеотидная последовательность, кодирующая полипептиды (а) или (b). То изобретение дополнительно содержит способ выражения или доставки такого выражения полинуклеотиды через вирусные векторы и / или вирусные частицы. То изобретение дополнительно содержит полипептид, содержащий два или более из следующих компонентов: Т-эпитопные последовательности, идентифицированные в SEQ ID NOS: 8281-8486, или а полинуклеотид, кодирующий такой полипептид.

[0306] использование в качестве антигена предпочтительно использовать: (1) в качестве Т-клетки антиген; (2) для генерирования комплекса между белком МНС класса I (например а class I HLA) и фрагмент указанного антигена; (3) в качестве антигена для повышение клеточно-опосредованного иммунного ответа; и / или (4) в качестве антигена для повышение ответа CTL. Польза предпочтительно защищает или обрабатывает заболевание и / или инфекция, вызванная вирусом SARS. Изобретение обеспечивает применение полипептида в производстве лекарственного средства для иммунизации а млекопитающее (типично человек) против инфекции SARS вирусной где полипептид как определено выше.

[0307] в изобретении предложен способ повышения иммунного ответа у человека в условиях искусственного кровообращения. млекопитающее (как правило, человек), включающее в себя этап введения в организм млекопитающее а полипептид, как определено выше, где указанный иммунный ответ представляет собой клеточно-опосредованный иммунный ответ и, предпочтительно, реакция CTL. Иммунная система ответ является предпочтительно защитным или терапевтическим.

[0308] изобретение включает полипептид, содержащий SEQ ID NO: 6044. Изобретение включает полипептид, содержащий фрагмент SEQ ID NO: 6044 или последовательность, имеющая идентификатор последовательности для SEQ ID NO: 206. То изобретение включает в себя полинуклеотид, кодирующий SEQ ID NO: 6044.

[0309] SEQ ID NO: 6044 идентифицируется как гипотетический белок. Предсказанный идентифицированы гидрофобные или трансмембранные области SEQ ID NO: 6044 ниже: ТАБЛИЦА-США-00018 от к центру счета Внутри к внешним спиралам: 3 найдено 1 (1) 17 (15) 891 8 47 (47) 66 (63) 221 56 Снаружи внутрь спиралы: 4 найдено 1 (4) 21 (19) 599 11

[0310] соответственно изобретение включает полипептид, содержащий а фрагмент SEQ ID NO: 6044 где указанный фрагмент не включает в себя один или больше гидрофобных аминокислотных последовательностей идентифицировано выше. Предпочтительно, чтобы фрагмент не включал аминокислоты между позиции 1-19. Изобретение также включает в себя полинуклеотидную последовательность кодирование любого из указанных выше полипептидов.

[0311] SEQ ID NO: 6044 прогнозируется как гипотетический белок атипичной пневмонии вирус. Установлен прогноз локализации белка SEQ ID NO: 6044 далее ниже. SEQ ID NO: 6044, как ожидается, будет расположен в одном из следующие положения: ядро, митохондриальная матрица, лизосома (люмен), и микробное тело (пероксисома). SEQ ID NO: 6044 может быть связан с органелла внутри зараженной клетки.

[0312] соответственно, SEQ ID NO: 6044 является мишенью для скрининга химических веществ ингибиторы вируса ОРВИ. Изобретение включает полипептид содержит SEQ ID NO: 6044 или его фрагмент изобретение включает в себя полинуклеотид, кодирующий полипептидную последовательность SEQ ID NO: 6044 или а фрагмент его. Изобретение включает способ экранирования SEQ ID NO: 6044 для ингибитора. Изобретение включает рекомбинантную экспрессию из SEQ ID NO: 6044 в основной ячейке. Изобретение включает в себя небольшой молекула которая предотвращает полипептид SEQ ID нет: 6044 от ассоциируется с органеллой внутри зараженной клетки. Изобретение включает в себя белок слияния, где указанный белок слияния содержит SEQ ID Нет: 6044. ТАБЛИЦА-США-00019 PSORT - - - прогнозирование сайтов локализации белка для SEQ ID NO: 6044 версия 6.4 (WWW) 154 остатка Классификация видов: 4 *** Шаг Рассуждения: 1 Предварительный расчет ALOM (порог: 0.5) количество: 0 McG: изучение последовательности сигналов (McGeoch) Длина UR: 7 Пиковое значение UR: 1.06 Чистый заряд CR: 1 Дискриминантный Балл: -7.97 GvH: изучение последовательности сигналов (von Heijne) Оценка Сигнала (-3.5): -3.28 Возможное место расщепления: 34 >>>>>> Похоже, что нет N-концевого сигнала seq. Аминокислотный состав прогнозируемой зрелой формы: рассчитано от 1 ALOM new cnt: 0 * * thrshld изменен на -2 Расщепляемый сигнал был обнаружен в ALOM?: 0B ALOM: поиск трансмембранных областей (Klein et al.) количество: 0 значение: 1.43 порог: -2.0 Периферийное правдоподобие = 1,43 модифицированный балл ALOM: -1.19 Молоток: изучение границы митохондриального таргетинга seq. мотив по адресу: 151 FRKKQV Дискриминация митохондриальной мишени seq.: notclr (-0.46) *** Шаг Рассуждения: 2 Количество KDEL: 0 Контроль аполярного сигнала для внутримитохондриальной сортировки (Положение молотка 151) от: 46 до: 50 оценка: 5,0 Митохондриальный матрикс? Оценка: 0.36 СКЛ-мотив (сигнал для пероксисомного белка): поз: -1 (154), кол-во: 0 Тенденция состава аминокислоты для пероксисомы: 0.61 Пероксисомные белки? Статус: notclr Оценка AAC (peroxisome): 0.149 Тенденция аминокислотного состава для лизосомальных белков оценка: 0.81 статус: notclr Модифицированная оценка для лизосомы: 0.231 Проверка количества основных остатков (ядро) Проверка схемы остатков 4 для ядерного целеуказания Найдено: pos: 134 (3) КНKK Проверка схемы остатков 7 для ядерного целеуказания (Положение консенсуса Robbins & Dingwall (ядро) Найдено: pos: 136 (3) КК VSTNLCTHSF RKKQV Итоговый счет Роббинса (ядро): 0.60 Проверка мотива связывания РНК (ядро или цитоплазма) НУК видоизменен. Оценка: 0.90 Состояние ядерного сигнала: положительный (0.70) Проверка мотива Saax.. Проверка N-миристоилирования.. Проверка мотива Saax.. ----- окончательный результат ----- ядро-определенность = 0,880 (утвердительно) <succ> пространство митохондриальной матрицы - - - определенность = 0,360 (утвердительно) <succ> лизосома (люмен) - - - определенность = 0,231 (утвердительно) <succ> микробное тело (пероксисома) - - - определенность = 0,149 (утвердительно) <succ>

[0313] одно предсказанное место о-гликозилирования SEQ ID NO: 6044 is идентифицировано по остатку 4: ТАБЛИЦА-США-00020 Остаток Нет. Назначение Потенциального Порога Thr 4 0.6839 0.6484 T

[0314] соответственно изобретение содержит полипептид, содержащий а фрагмент аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 6044, где указано фрагмент содержит о-гликозилированный участок, указанный выше. То изобретение дополнительно содержит полинуклеотид, кодирующий один или несколько из следующих компонентов: полипептиды идентифицированы выше.

[0315] изобретение включает полипептид, содержащий фрагмент SEQ ID нет: 6044 где указанный фрагмент не включает в себя один или несколько из следующих фрагментов: сайты гликозилирования определены выше. Изобретение также включает в себя полинуклеотид, кодирующий такой полипептид.

[0316] Т-эпитопы для SEQ ID NO: 6044 идентифицированы в таблице 18. То изобретение включает в себя полипептид для использования в качестве антигена, причем полипептид содержит: (а) аминокислотную последовательность, выбранную из группы состоящий из последовательностей Т-эпитопа, идентифицированных в SEQ ID NOS: 8487-8665; (b) аминокислотная последовательность, имеющая тождественность последовательности к аминокислотная последовательность (а). Изобретение дополнительно содержит а полинуклеотидная последовательность, кодирующая полипептиды (а) или (b). То изобретение дополнительно содержит способ выражения или доставки такого выражения полинуклеотиды через вирусные векторы и / или вирусные частицы. То изобретение дополнительно содержит полипептид, содержащий два или более из следующих компонентов: Т-эпитопные последовательности, идентифицированные в SEQ ID NOS: 8487-8665, или а полинуклеотид, кодирующий такой полипептид.

[0317] использование в качестве антигена предпочтительно использовать: (1) в качестве Т-клетки антиген; (2) для генерирования комплекса между белком МНС класса I (например а class I HLA) и фрагмент указанного антигена; (3) в качестве антигена для повышение клеточно-опосредованного иммунного ответа; и / или (4) в качестве антигена для повышение ответа CTL. Польза предпочтительно защищает или обрабатывает заболевание и / или инфекция, вызванная вирусом SARS. Изобретение обеспечивает применение полипептида в производстве лекарственного средства для иммунизации а млекопитающее (типично человек) против инфекции SARS вирусной где полипептид как определено выше.

[0318] в изобретении предложен способ повышения иммунного ответа у человека, получающего инсулин. млекопитающее (как правило, человек), включающее в себя этап введения в организм млекопитающее а полипептид, как определено выше, где указанный иммунный ответ представляет собой клеточно-опосредованный иммунный ответ и, предпочтительно, реакция CTL. Иммунная система ответ является предпочтительно защитным или терапевтическим.

[0319] изобретение включает полипептидную последовательность, содержащую SEQ ID Нет: 6045. Изобретение включает полипептидную последовательность, содержащую аминокислотная последовательность, имеющая идентичность последовательности SEQ ID NO: 6045. То изобретение включает полипептидную последовательность, содержащую фрагмент SEQ ID Нет: 6045. Изобретение включает полинуклеотидную последовательность, кодирующую любую из этих полипептидов.

[0320] SEQ ID NO: 6045 демонстрирует функциональные гомологии с огибающей или мелкий мембранный белок коронавируса. Изобретение включает в себя: диагностический набор, содержащий полипептид, содержащий SEQ ID NO: 6045 или а фрагмент его. Изобретение включает диагностический набор, содержащий: полинуклеотид, кодирующий SEQ ID NO: 6045 или его фрагмент. То изобретение включает иммуногенную композицию, содержащую SEQ ID NO: 6045 или его фрагмент. Изобретение включает антитело, которое распознает полипептид, содержащий SEQ ID NO: 6045 или фрагмент из этого.

[0321] определены прогнозируемые трансмембранные области SEQ ID NO: 6045 ниже: ТАБЛИЦА-US-00021 от к центру счета Внутри к внешним спиралам: 1 найдено 17 (19) 33 (33) 2881 26 Снаружи внутри спирали: 1 найдено 17 (17) 34 (34) 2981 27

[0322] соответственно изобретение включает полипептид, содержащий а фрагмент SEQ ID NO: 6045 где указанный фрагмент не включает в себя один или больше гидрофобных аминокислотных последовательностей идентифицировано выше. Предпочтительно, чтобы фрагмент не включал аминокислоты между позициями 17-34. Изобретение также включает в себя полинуклеотидную последовательность кодирование любого из указанных выше полипептидов. В одном варианте осуществления, the изобретение включает полипептид, содержащий фрагмент SEQ ID NO: 6045 где указанный фрагмент не содержит аминокислотных остатков 1-34 SEQ ID Нет: 6045.

[0323] прогнозируемый участок локализации белка SEQ ID NO: 6045 находится ниже. ТАБЛИЦА-US-00022 PSORT - - - прогнозирование сайтов локализации белка для SEQ ID NO: 6045 версия 6.4 (WWW) Классификация видов: 4 *** Шаг Рассуждения: 1 Предварительный расчет ALOM (порог: 0.5) количество: 2 Положение самого N-образного терминала TMS: 17 при i = 1 MTOP: топология мембраны (Hartmann et al.) И (середина): 24 дифференс обязанности (K-H): 2,0 McG: изучение последовательности сигналов (McGeoch) Длина UR: 29 Пиковое значение UR: 3.40 Чистый заряд CR: -2 Дискриминантный Балл: 13.07 GvH: изучение последовательности сигналов (von Heijne) Оценка Сигнала (-3.5): 4.37 Возможное место расщепления: 32 ... положительное значение mtop ... > > > > > Похоже, что у вас есть неразрешимый N-терм сигнал seq. Аминокислотный состав прогнозируемой зрелой формы: рассчитано от 1 ALOM new cnt: 1 * * thrshld изменен на -2 Расщепляемый сигнал был обнаружен в ALOM?: 0B ALOM: поиск трансмембранных областей (Klein et al.) количество: 1 значение: -15.12 порог: -2.0 Интегральное правдоподобие = -15.12 трансмембранный 17-33 (8-44) Периферийное правдоподобие = 0.47 модифицированный балл ALOM: 3.12 > > > > > Похоже, что это мембранный белок типа Ib (Nexo Cсут) Цитоплазматический хвост составляет от 34 до 76 (44 остатка) Правило: везикулярный путь Правило: везикулярный путь Правило: везикулярный путь (6) или неразрешимый? Молоток: изучение границы митохондриального таргетинга seq. мотив по адресу: 6 Неразрешимый вопрос? IPO установлено на: 16 Дискриминация митохондриальной мишени seq.: notclr (0.19) Правило: везикулярный путь Правило: везикулярный путь Правило: везикулярный путь *** Шаг Рассуждения: 2 > Относительное положение конца хвоста: 44% Мэмб.протеин с unceavable signl часто на ER Количество KDEP: 0 Контроль аполярного сигнала для внутримитохондриальной сортировки (Положение молотка 16) от: 70 до: 99 оценка: 21.5 > > > > > Похоже, что у него есть внутримитохондриальный сигнал СКЛ-мотив (сигнал для пероксисомного белка): пос: -1(76), кол-во: 0 Тенденция аминокислотного состава для перукисомы: -4.11 Пероксисомные белки? Статус: отрицательный Тенденция аминокислотного состава для лизосомальных белков оценка: 0.68 статус: notclr Проверка количества основных остатков (ядра) Проверка схемы остатков 4 для ядерного целеуказания Проверка схемы остатков 7 для ядерного целеуказания Проверка консенсуса Robbins & Dingwall (ядро) Проверка мотива связывания РНК (ядро или цитоплазма) Состояние ядерного сигнала: отрицательный (0.00) Проверьте цитоплазматический хвост на typeIb (plasma memb.) Проверка мотива NPXY.. Проверка мотива YXRF.. Проверка N-миристоилирования.. ----- окончательный результат ----- плазматическая мембрана - - - определенность = 0,730 (утвердительно) <succ> эндоплазматический ретикулум (мембрана) - - - достоверность = 0,640 (утвердительно) < succ> эндоплазматический ретикулум (просвет) --- достоверность = 0,100 (утвердительно) < succ> вне - - - определенность = 0.100 (утвердительно) <succ>

[0324] определены прогнозируемые участки N-гликозилирования SEQ ID NO: 6045 по остаткам 48 и 66: ТАБЛИЦА-США-00023 Jury NGlyc Позиция потенциальный результат соглашения 48 NVSL 0.6514 (9/9) ++ (SEQ ID NO: 7266) 66 NSSE 0.5880 (7/9) + (SEQ ID NO: 7267)

[0325] соответственно изобретение содержит полипептид, содержащий а фрагмент аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 6045, где указано фрагмент содержит один или более из выявленных участков N-гликозилирования выше. Изобретение содержит полипептид, содержащий фрагмент SEQ ID NO: 6045 где указанный фрагмент содержит один или несколько из следующих фрагментов: Сайты N-гликозилирования, указанные выше. Изобретение дополнительно содержит а полинуклеотид, кодирующий один или несколько из указанных выше полипептидов.

[0326] изобретение включает полипептид, содержащий фрагмент SEQ ID NO: 6045 где указанный фрагмент не включает в себя один или несколько из следующих фрагментов: сайты гликозилирования определены выше. Изобретение также включает в себя полинуклеотид, кодирующий такой полипептид.

[0327] т-эпитопы для SEQ ID NO: 6045 идентифицированы в таблице 19. То изобретение включает в себя полипептид для использования в качестве антигена, причем полипептид содержит: (а) аминокислотную последовательность, выбранную из группы состоящей из последовательностей Т-эпитопа, идентифицированных в SEQ ID NOS: 8666-8820; (b) аминокислотная последовательность, имеющая тождественность последовательности к аминокислотная последовательность (а). Изобретение дополнительно содержит а полинуклеотидная последовательность, кодирующая полипептиды (а) или (b). То изобретение дополнительно содержит способ выражения или доставки такого выражения полинуклеотиды через вирусные векторы и / или вирусные частицы. То изобретение дополнительно содержит полипептид, содержащий два или более из следующих компонентов: Т-эпитопные последовательности, идентифицированные в SEQ ID NOS: 8666-8820, или а полинуклеотид, кодирующий такой полипептид.

[0328] использование в качестве антигена предпочтительно использовать: (1) в качестве Т-клетки антиген; (2) для генерирования комплекса между белком МНС класса I (например а class I HLA) и фрагмент указанного антигена; (3) в качестве антигена для повышение клеточно-опосредованного иммунного ответа; и / или (4) в качестве антигена для повышение ответа CTL. Польза предпочтительно защищает или обрабатывает заболевание и / или инфекция, вызванная вирусом SARS. Изобретение обеспечивает применение полипептида в производстве лекарственного средства для иммунизации а млекопитающее (типично человек) против инфекции SARS вирусной где полипептид как определено выше.

[0329] в изобретении предложен способ повышения иммунного ответа у человека в условиях искусственного кровообращения. млекопитающее (как правило, человек), включающее в себя этап введения в организм млекопитающее а полипептид, как определено выше, где указанный иммунный ответ представляет собой клеточно-опосредованный иммунный ответ и, предпочтительно, реакция CTL. Иммунная система ответ является предпочтительно защитным или терапевтическим.

[0330] изобретение включает полипептидную последовательность, содержащую SEQ ID Нет: 6046. Изобретение включает полипептидные последовательности, содержащие аминокислотная последовательность, имеющая идентичность последовательности SEQ ID NO: 6046. То изобретение включает полипептидную последовательность, содержащую фрагмент SEQ ID Нет: 6046. Изобретение включает полинуклеотид, кодирующий один из них полипептиды.

[0331] SEQ ID NO: 6046 имеет функциональную гомологию с матричным белком а коронавирус. Изобретение включает диагностический набор, содержащий: полипептид, содержащий SEQ ID NO: 6046 или его фрагмент. То изобретение включает диагностический набор, содержащий полинуклеотидное кодирование SEQ ID NO: 6046 или его фрагмент. Изобретение включает в себя: иммуногенная композиция, содержащая SEQ ID NO: 6046 или ее фрагмент. Изобретение включает антитело, которое распознает полипептид содержит SEQ ID NO: 6046 или его фрагмент.

[0332] определены прогнозируемые трансмембранные области SEQ ID NO: 6046 ниже. ТАБЛИЦА-US-00024 от к центру счета Внутри к внешним спиралам: 3 найдено 21 (21) 38 (36) 2412 29 51 (53) 69 (69) 2645 60 74 (82) 96 (96) 2464 89 Снаружи внутри спирали: 3 найдено 18 (21) 38 (38) 2363 28 52 (52) 67 (67) 2363 60 76 (76) 95 (92) 2605 84

[0333] соответственно изобретение включает полипептид, содержащий а фрагмент SEQ ID NO: 6046 где указанный фрагмент не включает в себя один или больше гидрофобных аминокислотных последовательностей идентифицировано выше. Предпочтительно, чтобы фрагмент не включал аминокислоты между должностями, выбранные из группы, состоящей из 18-38, 52-67 и 76 человек - до 95. Изобретение также включает полинуклеотидную последовательность, кодирующую любую из вышеперечисленных идентифицированных полипептидов.

[0334] установлена прогнозируемая локализация белка SEQ ID NO: 6046 ниже. ТАБЛИЦА-США-00025 PSORT - - - прогнозирование участков локализации белка версия 6.4 (WWW) Классификация видов: 4 *** Шаг Рассуждения: 1 Предварительный расчет ALOM (порог: 0.5) количество: 3 Положение самого N-образного терминала TMS: 21 при i = 1 МТОР: топология мембраны (Hartmann et al.) И (середина): 28 дифференс обязанности (К-Н): 6,0 McS: изучение последовательности сигналов (McGeoch) Длина UR: 1 Пиковое значение UR: 3.16 Чистый заряд CR: -3 Дискриминантный Балл: 2.21 GvH: изучение последовательности сигналов (von Heijne) Оценка Сигнала (-3.5): 4.29 Возможное место расщепления: 39 ... положительное значение mtop ... >>>>> Похоже, что у вас есть неразрешимый N-терм сигнал seq. Аминокислотный состав прогнозируемой зрелой формы: рассчитано от 1 Расщепляемый сигнал был обнаружен в ALOM?: 0B ALOM: поиск трансмембранных областей (Klein et al.) количество: 3 Значение: -7,64 порог: 0,5 Интегральное правдоподобие = -7,64 трансмембранный 21-37 (18-39) Интегральное правдоподобие = -7,59 Трансмембрана 50-66 (43-72) Интегральное правдоподобие = -5,04 Трансмембрана 79-95 (72-99) Периферийное правдоподобие = 2,38 модифицированный балл ALOM: 2.13 >>>>> Вероятно мембранный белок типа IIIb (Nexo Ссут) Правило: везикулярный путь Правило: везикулярный путь Правило: везикулярный путь (2) или неразрешимый? Молоток: изучение границы митохондриального таргетинга seq. мотив по адресу: 2 Неразрешимый вопрос? IPO установлено на: 12 Дискриминация митохондриальной мишени seq.: минус (-4.16) Правило: везикулярный путь Правило: везикулярный путь Правило: везикулярный путь *** Шаг Рассуждения: 2 Тип IIIa или IIIb благоволит к для ER memb. белковая пища Мэмб.протеин с unceivable signl часто на ER Количество KDEL: 0 Контроль аполярного сигнала для внутримитохондриальной сортировки СКЛ-мотив (сигнал для пероксисомного белка): поз: -1(221), кол-во: 0 Тенденция состава аминокислоты для пероксисомы: 5.01 Пероксисомные белки? Статус: notclr Тенденция аминокислотного состава для лизосомальных белков оценка: 2.30 статус: положительный Белки III типа могут локализоваться в Гольджи Проверка количества основных остатков (ядра) Проверка схемы остатков 4 для ядерного целеуказания Проверка схемы остатков 7 для ядерного целеуказания Проверка консенсуса Robbins & Dingwall (ядро) Проверка мотива связывания РНК (ядро или цитоплазма) Состояние ядерного сигнала: отрицательный (0.00) Проверьте количество TMSs для typeIII (plasma memb.) Проверка N-миристоилирования.. ---- окончательный результат ---- эндоплазматический ретикулум (мембрана) - - - достоверность = 0,685 (утвердительно) <succ> плазматическая мембрана - - - определенность = 0,640 (утвердительно) <succ> Тело Гольджи - - - определенность = 0,460 (утвердительно) <succ> эндоплазматический ретикулум (просвет) --- достоверность = 0,100 (утвердительно) <succ>

[0335] одно предсказанное место N-гликозилирования SEQ ID NO: 6046 is идентифицировано по остатку 4:

[0336] предсказание участков N-гликозилирования ТАБЛИЦА-США-00026 Jury NGlyc Позиция потенциальный результат соглашения 4 NGTI 0.8430 (9/9) + + + (SEQ ID NO: 7268)

[0337] соответственно изобретение содержит полипептид, содержащий а фрагмент аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 6046, где указано фрагмент содержит участок N-гликозилирования, указанный выше. То изобретение дополнительно содержит полинуклеотид, кодирующий один или несколько из следующих компонентов: полипептиды идентифицированы выше.

[0338] изобретение дополнительно содержит полипептид, содержащий а фрагмент аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 6046, где указанный фрагмент не включает в себя сайт N-гликозилирования, указанный выше. Изобретение включает в себя полинуклеотид, кодирующий такой фрагмент.

[0339] вариант SEQ ID NO: 6046, включенный в изобретение is SEQ ID NO: 9963. Сравненный к ID SEQ никакому: 6046, эта последовательность имеет Val на остаток 72 вместо Ala.

[0340] Т-эпитопы для SEQ ID NO: 6046 идентифицированы в таблице 20. То изобретение включает в себя полипептид для использования в качестве антигена, причем полипептид содержит: (а) аминокислотную последовательность, выбранную из группы состоящей из последовательностей Т-эпитопа, идентифицированных в SEQ ID NOS: 8821-9018; (b) аминокислотная последовательность, имеющая тождественность последовательности к аминокислотная последовательность (а). Изобретение дополнительно содержит а полинуклеотидная последовательность, кодирующая полипептиды (а) или (b). То изобретение дополнительно содержит способ выражения или доставки такого выражения полинуклеотида через вирусные векторы и / или вирусные частицы. То изобретение дополнительно содержит полипептид, содержащий два или более из следующих компонентов: Т-эпитопные последовательности, идентифицированные в SEQ ID NOS: 8821-9018, или а полинуклеотид, кодирующий такой полипептид.

[0341] использование в качестве антигена предпочтительно использовать: (1) в качестве Т-клетки антиген; (2) для генерирования комплекса между белком МНС класса I (например а class I HLA) и фрагмент указанного антигена; (3) в качестве антигена для повышение клеточно-опосредованного иммунного ответа; и / или (4) в качестве антигена для повышение ответа CTL. Польза предпочтительно защищает или обрабатывает заболевание и / или инфекция, вызванная вирусом SARS. Изобретение обеспечивает применение полипептида в производстве лекарственного средства для иммунизации а млекопитающее (типично человек) против инфекции SARS вирусной где полипептид как определено выше.

[0342] в изобретении предложен способ повышения иммунного ответа у человека в условиях искусственного кровообращения. млекопитающее (как правило, человек), включающее в себя этап введения в организм млекопитающее а полипептид, как определено выше, где указанный иммунный ответ представляет собой клеточно-опосредованный иммунный ответ и, предпочтительно, реакция CTL. Иммунная система ответ является предпочтительно защитным или терапевтическим.

[0343] изобретение включает полипептидную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 6047 или его фрагмент, или аминокислотная последовательность, имеющая последовательность тождественность этому. Прогнозируемые трансмембранные области SEQ ID NO: 6047 являются определены ниже. ТАБЛИЦА-US-00027 от к центру счета Внутри к внешним спиралам: 2 найдено 7 (10) 29 (27) 729 17 21 (24) 41 (41) 640 34 Снаружи внутри спирали: 2 найдено 4 (4) 22 (19) 874 12 22 (24) 41 (41) 499 31

[0344] соответственно, изобретение включает полипептид, содержащий а фрагмент SEQ ID NO: 6047 где указанный фрагмент не включает в себя один или больше гидрофобных аминокислотных последовательностей идентифицировано выше. Предпочтительно, чтобы фрагмент не включал аминокислоты между должностями, выбранные из группы, состоящей из 4 до 22 и 22 до 41. То изобретение также включает в себя полинуклеотидную последовательность, кодирующую любой из над-определенные полипептиды.

[0345] SEQ ID NO: предсказано, что 6047 будет гипотетическим белком SARS вирус. Установлен прогноз локализации белка SEQ ID NO: 6047 далее ниже. SEQ ID NO: 6047, как ожидается, будет расположен в одном из следующие местоположения: плазматическая мембрана, эндоплазматический ретикулум, тело Гольджи, и микрофлоры (пероксисомы). SEQ ID NO: 6047 может быть связано с органелла внутри зараженной клетки или с вирусным входом к клетке хозяина.

[0346] соответственно, SEQ ID NO: 6047 является мишенью для скрининга химических веществ ингибиторы вируса ОРВИ. Изобретение включает полипептид содержит SEQ ID NO: 6047 или его фрагмент. Изобретение включает в себя: полинуклеотид, кодирующий полипептидную последовательность SEQ ID NO: 6047 или а фрагмент его. Изобретение включает способ экранирования SEQ ID NO: 6047 для ингибитора. Изобретение включает рекомбинантную экспрессию из SEQ ID NO: 6047 в основной ячейке. Изобретение включает в себя небольшой молекула которая предотвращает полипептид SEQ ID нет: 6047 от связывание с органеллой внутри инфицированной клетки или взаимодействие с мембраной клетки хозяина. Изобретение включает в себя синтез белка где указанный белок слияния содержит SEQ ID NO: 6047. Прогнозируемый белок локализация SEQ ID NO: 6047 изложена ниже. ТАБЛИЦА-US-00028 PSORT - - - прогнозирование участков локализации белка версия 6.4 (WWW) Классификация видов: 4 *** Шаг Рассуждения: 1 Предварительный расчет ALOM (порог: 0.5) количество: 1 Положение самого N-образного терминала TMS: 2 при i = 1 МТОР: топология мембраны (Hartmann et al.) И (середина): дифференс обязанности 9 (К - Н): 0,5 McS: изучение последовательности сигналов (McGeoch) Длина UR: 6 Пиковое значение UR: 3.08 Чистый заряд CR: 0 Дискриминантный Балл: 5.12 GvH: изучение последовательности сигналов (von Heijne) Оценка Сигнала (-3.5): -4.45 Возможное место расщепления: 34 >>>>> Похоже, что у вас есть неразрешимый N-терм сигнал seq. Аминокислотный состав прогнозируемой

зрелой формы: рассчитано от 1 ALOM new cnt: 1 * * thrshld изменен на -2 Расщепляемый сигнал был обнаружен в ALOM?: 0B ALOM: поиск трансмембранных областей (Klein et al.) количество: 1 значение: -2.44 порог: -2.0 Интегральное правдоподобие = -2.44 Трансмембрана 2-18 (1-20) Периферийное правдоподобие = 1.22 модифицированный балл ALOM: 0.59 > > > > > По-видимому, это мембранный белок типа II (Ncut Sехo) Цитоплазматический хвост находится от 1 до 1 (1 остатков) Правило: везикулярный путь Правило: везикулярный путь Правило: везикулярный путь (5) или неразрешимый? Молоток: изучение границы митохондриального таргетинга seq. мотив по адресу: 5 Неразрешимый вопрос? IPO установлено на: 15 Дискриминация митохондриальной мишени seq.: notclr (1.48) Правило: везикулярный путь Правило: везикулярный путь Правило: везикулярный путь *** Шаг Рассуждения: 2 Относительное положение цитоплазматического хвоста: 1% Больше значение (>30%) является предпочтительным для ER memb. белковая пища Мэмб.протеин с unceavable signl часто на ER Количество KDEL: 0 Контроль аполярного сигнала для внутримитохондриальной сортировки (Положение молотка 15) от: 64 до: 93 оценка: 30.0 > > > > > Похоже, что у него есть внутримитохондриальный сигнал СКЛ-мотив (сигнал для пероксисомного белка): пос: -1(63), кол-во: 0 Тенденция состава аминокислоты для пероксисомы: 1.91 Пероксисомные белки? Статус: notclr Оценка AAC (peroxisome): 0.161 Тенденция аминокислотного состава для лизосомальных белков оценка: 0.04 статус: notclr Проверка консенсуса по Гольджи Проверка консенсуса по Гольджи Проверка цитоплазматического хвоста II типа (Гольджи) Проверка количества основных остатков (ядра) Проверка схемы остатков 4 для ядерного целеуказания Проверка схемы остатков 7 для ядерного целеуказания Проверка консенсуса Robbins & Dingwall (ядро) Проверка мотива связывания РНК (ядро или цитоплазма) Состояние ядерного сигнала: отрицательный (0.00) Проверьте митохондриальный сигнал для typeII (plasma memb.) Тип II благоприятствует для плазмы memb. белковая пища Проверка мотива NPXY.. Проверка мотива YXRF.. Проверка N-миристоилирования.. --- -- окончательный результат ---- плазматическая мембрана - - - определенность = 0,685 (утвердительный ответ) <succ> эндоплазматический ретикулум (мембрана) - - - достоверность = 0,640 (утвердительно) <succ> Тело Гольджи - - - определенность = 0,370 (утвердительный ответ) <succ> микробное тело (пероксисома) - - - определенность = 0,161 (утвердительный ответ) <succ>

[0347] Т-эпитопы для SEQ ID NO: 6047 идентифицированы в таблице 21. То изобретение включает в себя полипептид для использования в качестве антигена, причем полипептид содержит: (а) аминокислотную последовательность, выбранную из группы состоящий из последовательностей Т-эпитопа, идентифицированных в SEQ ID NOS: 9019-9131; (b) аминокислотная последовательность, имеющая тождественность последовательности с Ан аминокислотная последовательность (а). Изобретение дополнительно содержит а полинуклеотидная последовательность, кодирующая полипептиды (а) или (b). То изобретение дополнительно содержит способ выражения или доставки такого выражения полинуклеотиды через вирусные векторы и / или вирусные частицы. То изобретение дополнительно содержит полипептид, содержащий два или более из следующих компонентов: Т-эпитопные последовательности, идентифицированные в SEQ ID NOS: 9019-9131, или а полинуклеотид, кодирующий такой полипептид.

[0348] использование в качестве антигена предпочтительно использовать: (1) в качестве Т-клетки антиген; (2) для генерирования комплекса между белком МНС класса I (например а class I HLA) и фрагмент указанного антигена; (3) в качестве антигена для повышение клеточно-опосредованного иммунного ответа; и / или (4) в качестве антигена для повышение ответа CTL. Польза предпочтительно защищает или обрабатывает заболевание и / или инфекция, вызванная вирусом SARS. Изобретение обеспечивает применение полипептида в производстве лекарственного средства для иммунизации а млекопитающее (типично человек) против инфекции SARS вирусной где полипептид как определено выше.

[0349] в изобретении предложен способ повышения иммунного ответа у человека в условиях искусственного кровообращения. млекопитающее (как правило, человек), включающее в себя этап введения в организм млекопитающее а полипептид, как определено выше, где указанный иммунный ответ представляет собой клеточно-опосредованный иммунный ответ и, предпочтительно, реакция CTL. Иммунная система ответ является предпочтительно защитным или терапевтическим.

[0350] изобретение включает полипептид, содержащий SEQ ID NO: 6048, а фрагмент его или аминокислотная последовательность, имеющая идентичность последовательности к этому. Прогнозируемые трансмембранные области SEQ ID NO: 6048 являются определены ниже. ТАБЛИЦА-США-00029 от к центру счета Внутри к внешним спиралам: 2 найдено 3 (3) 18 (18) 1857 10 100 (100) 117 (115) 2904 107 Снаружи внутрь спирали: 2 найдено 1 (1) 15 (15) 1299 8 100 (100) 117 (115) 3009 107

[0351] соответственно, изобретение включает полипептид, содержащий а фрагмент SEQ ID NO: 6048 где указанный фрагмент не включает в себя один или больше гидрофильных аминокислотных последовательностей идентифицировано выше. Предпочтительно, чтобы фрагмент не включал аминокислоты между должности, выбранные из группы, состоящей из 1 до 15 и 100 до 117. Изобретение также включает в себя полинуклеотидную последовательность, кодирующую любой из над-определенные полипептиды.

[0352] SEQ ID NO: прогнозируется, что 6048 является гипотетическим белком SARS вирус. Установлен прогноз локализации белка SEQ ID NO: 6048 далее ниже. SEQ ID NO: 6048, как ожидается, будет расположен в одном из следующие местоположения: плазматическая мембрана, лизосома (мембрана), микробное тело (пероксисома) и эндоплазматический ретикулум (мембрана). SEQ ID NO: 6048 май может быть связано с органеллой внутри инфицированной клетки или может взаимодействовать с плазматической мембраной клетки-хозяина во время вирусного входа к клетке-хозяину.

[0353] соответственно, SEQ ID NO: 6048 является мишенью для скрининга химических веществ ингибиторы вируса ОРВИ. Изобретение включает полипептид содержит SEQ ID NO: 6048 или его фрагмент. Изобретение включает в себя: полинуклеотид, кодирующий полипептидную последовательность SEQ ID NO: 6048 или а фрагмент его. Изобретение включает способ экранирования SEQ ID NO: 6048 для ингибитора. Изобретение включает рекомбинантную экспрессию из SEQ ID NO: 6048 в основной ячейке. Изобретение включает в себя небольшой молекула которая предотвращает полипептид SEQ ID нет: 6048 от связывающ с органеллой внутри зараженной клетки или предотвращает полипептид от связывать с мембраной клетки хозяина. То изобретение включает белок слияния, в котором указанный белок слияния содержит SEQ ID NO: 6048. Прогнозируемая локализация белка SEQ ID NO: 6048 установлен далее ниже. ТАБЛИЦА-США-00030 PSORT - - - прогнозирование участков локализации белка версия 6.4 (WWW) Классификация видов: 4 *** Шаг Рассуждения: 1 Предварительный расчет ALOM (порог: 0.5) количество: 2 Положение самого N-образного терминала TMS: 3 при i = 2 MTOP: топология мембраны (Hartmann et al.) И (середина): дифференс обязанности 10 (K-H): -2,5 McG: изучение последовательности сигналов (McGeoch) Длина UR: 13 Пиковое значение UR: 3.38 Чистый заряд CR: 1 Дискриминантная Оценка: 10.02 GvH: изучение последовательности сигналов (von Heijne) Оценка Сигнала (-3.5): 2.56 Возможное место расщепления: 15 > > > > > Похоже, что у расщепляемого N-терм сигнала seq. Аминокислотный состав прогнозируемой зрелой формы: рассчитано от 16 ALOM new cnt: 2 * * thrshld изменить на -2 Расщепляемый сигнал был обнаружен в ALOM?: 1B ALOM: поиск трансмембранных областей (Klein et al.) количество: 1 значение: -14.75 порог: -2.0 Интегральное правдоподобие = -14,75 Трансмембранная 101-117 (95-120) Периферийное правдоподобие = 6,63 модифицированный балл ALOM: 3.05 > > > > > Похоже, что это мембранный белок типа Ia Цитоплазматический хвост составляет от 118 до 122 (5 остатков) Правило: везикулярный путь Правило: везикулярный путь Правило: везикулярный путь (15) или неразрешимо? Молоток: изучение границы митохондриального таргетинга seq. мотив на: 15 Неразрешимый вопрос? IPO установлено на: 25 Дискриминация митохондриальной мишени seq.: notclr (0.73) Правило: везикулярный путь Правило: везикулярный путь Правило: везикулярный путь *** Шаг Рассуждения: 2 Количество KDEL: 0 Контроль аполярного сигнала для внутримитохондриальной сортировки (Положение молотка 25) от: 3 до: 12 оценка: 8.5 СКЛ-мотив (сигнал для пероксисомного белка): пос: -1 (122), кол-во: 0 Тенденция состава аминокислоты для пероксисомы: 2.46 AAK не из числа N-термов., оценка изменена Пероксисомные белки? Статус: notclr Оценка AAC (peroxisome): 0.115 Тенденция аминокислотного состава для лизосомальных белков оценка: -0.40 статус: отрицательный GY мотив в хвосте typeIa? (лизосомальный) Проверка количества основных остатков (ядра) Проверка схемы остатков 4 для ядерного целеуказания Проверка схемы остатков 7 для ядерного целеуказания Проверка консенсуса Robbins & Dingwall (ядро) Проверка мотива связывания РНК (ядро или цитоплазма) Состояние ядерного сигнала: отрицательный (0.00) Тип Ia является предпочтительным для плазмы memb. белковая пища Проверка мотива NPXY.. Проверка мотива YXRF.. Проверка N-миристоилирования.. Проверка привязки GPI.. > > > > > Похоже, что GPI-якорь (0.85) ---- окончательный результат ---- плазматическая мембрана - - - определенность = 0,919 (утвердительный ответ) <succ> лизосома (мембрана) - - - определенность = 0,200 (утвердительный ответ) <succ> микробное тело (пероксисома) - - - определенность = 0,115 (утвердительно) <succ> эндоплазматический ретикулум (мембрана) - - - достоверность = 0,100 (утвердительно) <succ>

[0354] Т-эпитопы для SEQ ID NO: 6048 идентифицированы в таблице 22. То изобретение включает в себя полипептид для использования в качестве антигена, причем полипептид содержит: (а) аминокислотную последовательность, выбранную из группы состоящий из последовательностей Т-эпитопа, идентифицированных в SEQ ID NOS: 9132-9308; (b) аминокислотная последовательность, имеющая тождественность последовательности к аминокислотная последовательность (а). Изобретение дополнительно содержит а полинуклеотидная последовательность, кодирующая полипептиды (а) или (b). То изобретение дополнительно содержит способ выражения или доставки такого выражения полинуклеотиды через вирусные векторы и / или

вирусные частицы. То изобретение дополнительно содержит полипептид, содержащий два или более из следующих компонентов: Т-эпитопные последовательности, идентифицированные в SEQ ID NOS: 9132-9308, или а полинуклеотид, кодирующий такой полипептид.

[0355] использование в качестве антигена предпочтительно использовать: (1) в качестве Т-клетки антиген; (2) для генерирования комплекса между белком МНС класса I (например a class I HLA) и фрагмент указанного антигена; (3) в качестве антигена для повышение клеточно-опосредованного иммунного ответа; и / или (4) в качестве антигена для повышение ответа CTL. Польза предпочтительно защищает или обрабатывает заболевание и / или инфекция, вызванная вирусом SARS. Изобретение обеспечивает применение полипептида в производстве лекарственного средства для иммунизации а млекопитающее (типично человек) против инфекции SARS вирусной где полипептид как определено выше.

[0356] в изобретении предложен способ повышения иммунного ответа у человека в условиях искусственного кровообращения. млекопитающее (как правило, человек), включающее в себя этап введения в организм млекопитающее а полипептид, как определено выше, где указанный иммунный ответ представляет собой клеточно-опосредованный иммунный ответ и, предпочтительно, реакция CTL. Иммунная система ответ является предпочтительно защитным или терапевтическим.

[0357] изобретение включает полипептид, содержащий SEQ ID NO: 6049, а фрагмент его или аминокислотная последовательность, именуемая идентичность последовательности к этому. Прогнозируемые трансмембранные или гидрофобные области SEQ ID нет: 6049 указаны ниже. ТАБЛИЦА-США-00031 от к центру счёта Внутри к внешним спиралам: 1 найдено 13 (13) 30 (28) 3532 20 Снаружи внутрь спирала: 1 найдено 9 (11) 29 (26) 3395 19

[0358] соответственно, изобретение включает полипептид, содержащий а фрагмент SEQ ID NO: 6049 где указанный фрагмент не включает в себя один или больше гидрофобных аминокислотных последовательностей идентифицировано выше. То изобретение также включает в себя полинуклеотидную последовательность, кодирующую любой из над-определенные полипептиды.

[0359] SEQ ID NO: прогнозируется, что 6049 является гипотетическим белком SARS вирус. Установлен прогноз локализации белка SEQ ID NO: 6049 далее ниже. SEQ ID NO: 6049, как ожидается, будет расположен в одном из следующие положения: снаружи, микробное тело (пероксисома), эндоплазматическое ретикулум (мембрана) и эндоплазматический ретикулум (просвет). Наиболее ранжирование указывает, что SEQ ID NO: 6049 расположен на внешней стороне а ячейка. Соответственно, SEQ ID NO: 6049 может быть поверхностным экспонированным белком.

[0360] соответственно, SEQ ID NO: 6049 может использоваться в иммуногенных системах. состав для повышения иммунного ответа против вируса ОРВИ. Это также может использоваться для выработки антител, специфичных к вирусу атипичной пневмонии. Такой антитела могут быть использованы в способе лечения или профилактики ОРВИ вирусная инфекция. Такие антитела могут быть дополнительно использованы в диагностическом тесте определить наличие или отсутствие вируса ОРВИ в биологическом образце.

[0361] изобретение включает полипептид, содержащий SEQ ID NO: 6049 или фрагмент его. Изобретение включает в себя полинуклеотид, кодирующий полипептидная последовательность SEQ ID NO: 6049 или ее фрагмент. То изобретение включает в себя способ экранирования SEQ ID NO: 6049 для Ан ингибитор. Изобретение включает рекомбинантную экспрессию SEQ ID Нет: 6049 в клетке-хозяине. Изобретение включает синтез белка, в котором указанный белок слияния содержит SEQ ID NO: 6049. Прогнозируемый белок локализация SEQ ID NO: 6049 изложена ниже. ТАБЛИЦА-US-00032 PSORT - - - прогнозирование участков локализации белка версия 6.4 (WWW) Классификация видов: 4 *** Шаг Рассуждения: 1 Предварительный расчет ALOM (порог: 0.5) количество: 1 Положение самого N-образного терминала TMS: 11 при i = 1 MTOP: топология мембраны (Hartmann et al.) И (середина): дифференс обязанности 18 (K - H): -2.0 McG: изучение последовательности сигналов (McGeoch) Длина UR: 24 Пиковое значение UR: 3.69 Чистый заряд CR: -2 Дискриминантный Балл: 13.56 GvH: изучение последовательности сигналов (von Heijne) Оценка Сигнала (-3.5): 0.52 Возможное место расщепления: 25 >>>>> Похоже, что у расщепляемого N-терм сигнала seq. Аминокислотный состав прогнозируемой зрелой формы: рассчитано от 26 ALOM new cnt: 1 * * thrshld изменен на -2 Расщепляемый сигнал был обнаружен в ALOM?: 1B ALOM: поиск трансмембранных областей (Klein et al.) количество: 0 значение: 14.80 порог: -2.0 Периферийное правдоподобие = 14,80 модифицированный балл ALOM: -3.86 Правило: везикулярный путь Правило: везикулярный путь Правило: везикулярный путь (2) или неразрешимый? Молоток: изучение границы митохондриального таргетинга seq. мотив по адресу: 2 Неразрешимый вопрос? IPO установлено на: 12 Дискриминация митохондриальной мишени seq.: notclg Оценка AAC (peroxisome): 0.320 Тенденция аминокислоты для пероксисомы: 9.47 AAK не из числа N-термов., оценка изменена Пероксисомные белки? Статус: notclg Оценка AAC (peroxisome): 0.320 Тенденция аминокислотного состава для лизосомальных белков оценка: -6.47 статус: отрицательный Количество NX (S/T) мотив: 0 Проверка количества основных остатков (ядра) Проверка схемы остатков 4 для ядерного целеуказания Проверка схемы остатков 7 для ядерного целеуказания Проверка консенсуса Robbins & Dingwall (ядро) Проверка мотива связывания РНК (ядро или цитоплазма) Состояние ядерного сигнала: отрицательный (0.00) Проверка мотива CaaX.. Проверка N-миристилирования.. Проверка мотива CaaX.. ---- окончательный результат ---- вне - - - определенность = 0,820 (утвердительно) <succ> микробное тело (пероксисома) - - - определенность = 0,320 (утвердительно) <succ> эндоплазматический ретикулум (мембрана) - - - достоверность = 0,100 (утвердительно) <succ> эндоплазматический ретикулум (просвет) --- достоверность = 0,100 (утвердительно) <succ>

[0362] Т-эпитопы для SEQ ID NO: 6049 идентифицированы в таблице 23. То изобретение включает в себя полипептид для использования в качестве антигена, причем полипептид содержит: (а) аминокислотную последовательность, выбранную из группы состоящий из последовательностей Т-эпитопа, идентифицированных в SEQ ID NOS: 9309-9437; (b) аминокислотная последовательность, имеющая тождественность последовательности к аминокислотная последовательность (а). Изобретение дополнительно содержит а полинуклеотидная последовательность, кодирующая полипептиды (а) или (b). То изобретение дополнительно содержит способ выражения или доставки такого выражения полинуклеотиды через вирусные векторы и / или вирусные частицы. То изобретение дополнительно содержит полипептид, содержащий два или более из следующих компонентов: Т-эпитопные последовательности, идентифицированные в SEQ ID NOS: 9309-9437, или а полинуклеотид, кодирующий такой полипептид.

[0363] использование в качестве антигена предпочтительно использовать: (1) в качестве Т-клетки антиген; (2) для генерирования комплекса между белком МНС класса I (например a class I HLA) и фрагмент указанного антигена; (3) в качестве антигена для повышение клеточно-опосредованного иммунного ответа; и / или (4) в качестве антигена для повышение ответа CTL. Польза предпочтительно защищает или обрабатывает заболевание и / или инфекция, вызванная вирусом SARS. Изобретение обеспечивает применение полипептида в производстве лекарственного средства для иммунизации а млекопитающее (типично человек) против инфекции SARS вирусной где полипептид как определено выше.

[0364] в изобретении предложен способ повышения иммунного ответа у человека, находящегося в состоянии покоя. млекопитающее (как правило, человек), включающее в себя этап введения в организм млекопитающее а полипептид, как определено выше, где указанный иммунный ответ представляет собой клеточно-опосредованный иммунный ответ и, предпочтительно, реакция CTL. Иммунная система ответ является предпочтительно защитным или терапевтическим.

[0365] изобретение включает полипептид, содержащий SEQ ID NO: 6050 или фрагмент их или аминокислотная последовательность, имеющая идентичность последовательности к этому. Определены прогнозируемые трансмембранные или гидрофобные области ниже. ТАБЛИЦА-США-00033 от к центру счёта Внутри к внешним спиралам: 1 найдено 13 (15) 32 (30) 558 23 Снаружи внутрь спирала: 1 найдено 16 (16) 30 (30) 364 23

[0366] соответственно, изобретение включает полипептид, содержащий а фрагмент SEQ ID NO: 6050, где указанный фрагмент не включает один или больше гидрофобных аминокислотных последовательностей идентифицировано выше. То изобретение также включает в себя полинуклеотидную последовательность, кодирующую любой из над-определенные полипептиды.

[0367] SEQ ID NO: предсказано, что 6050 будет гипотетическим белком SARS вирус. Установлен прогноз локализации белка SEQ ID NO: 6050 далее ниже. SEQ ID NO: 6050, как ожидается, будет расположен в одном из следующие положения: лизосома (люмен), митохондриальное пространство матрицы, митохондриальная внутренняя мембрана и митохондриальное межмембранное пространство. СЛЕД. ID NO: 6050 может быть связано с

органеллой внутри инфицированной клетки во время вирусного цикла репликации.

[0368] соответственно, SEQ ID NO: 6050 является мишенью для скрининга химических веществ ингибиторы вируса ОРВИ. Изобретение включает полипептид содержит SEQ ID NO: 6050 или его фрагмент. Изобретение включает в себя: полинуклеотид, кодирующий полипептидную последовательность SEQ ID NO: 6050 или а фрагмент его. Изобретение включает способ экранирования SEQ ID NO: 6050 для ингибитора. Изобретение включает рекомбинантную экспрессию SEQ ID NO: 6050 в основной ячейке. Изобретение включает в себя небольшой молекула которая предотвращает полипептид SEQ ID нет: 6050 от связывающ с органеллой внутри зараженной клетки или предотвращает полипептид от связывать с мембраной клетки хозяина. То изобретение включает белок слияния, в котором указанный белок слияния содержит SEQ ID NO: 6050. Прогнозируемая локализация белка SEQ ID NO: 6050 устанавливается далее ниже. ТАБЛИЦА-США-00034 PSort - - - прогнозирование участков локализации белка версия 6.4 (WWW) Myseq 84 остатки Классификация видов: 4 *** Шаг Рассуждения: 1 Предварительный расчет ALOM (порог: 0.5) количество: 0 McG; изучение последовательности сигналов (McGeoch) Длина UR: 3 Пиковое значение UR: 1.46 Чистый заряд CR: 2 Дискриминантный Балл: -5.73 GvH: изучение последовательности сигналов (von Heijne) Оценка Сигнала (-3.5): -0.12 Возможное место расщепления: 29 >>>>>> Похоже, что нет N-концевого сигнала seq. Аминокислотный состав прогнозируемой зрелой формы: рассчитано от 1 ALOM new cnt: 0 * * thrsld изменен на -2 Расщепляемый сигнал был обнаружен в ALOM?: 0B ALOM: поиск трансмембранных областей (Klein et al.) количество: 0 значение: 8.43 порог: -2.0 Периферийное правдоподобие = 8.43 модифицированный балл ALOM: -2.59 Молоток: изучение границы митохондриального таргетинга seq. мотив по адресу: 61 ARCWYL Дискриминация митохондриальной мишени seq.: положительный (1.66) Правило: митохондриальный белок Правило: митохондриальный белок Правило: митохондриальный белок *** Шаг Рассуждения: 2 Количество KDEL: 0 Контроль аноплярного сигнала для внутримитохондриальной сортировки (Положение молотка 61) от: 52 до: 58 оценка: 6,0 Митохондриальный матрикс? Оценка: 0.38 СКЛ-мотив (сигнал для пероксисомного белка): пос: -1(84), кол-во: 0 Тенденция состава аминокислоты для пероксисомы: 1.47 Пероксисомные белки? Статус: potclr Оценка AAC (peroxisome): 0.263 Тенденция аминокислотного состава для лизосомальных белков оценка: 2.86 статус: положительный Модифицированная оценка для лизосомы: 0.850 Проверка количества основных остатков (ядра) Проверка схемы остатков 4 для ядерного целеуказания Проверка схемы остатков 7 для ядерного целеуказания Проверка консенсуса Robbins & Dingwall (ядро) Проверка мотива связывания РНК (ядро или цитоплазма) Состояние ядерного сигнала: отрицательный (0.00) Проверка мотива СааХ. Проверка N-миристоилирования. Проверка мотива СааХ. ----- окончательный результат ----- лизосома (просвет) - - - определенность = 0,850 (утвердительно) < succ> пространство митохондриальной матрицы - - - определенность = 0,544 (утвердительно) succ> внутренняя мембрана митохондрий - - - определенность = 0,266 (утвердительно) succ> митохондриальное межмембранное пространство - - - определенность = 0,266 (утвердительно) < succ>

[0369] одно предсказанное место N-гликозилирования SEQ ID NO: 6050 is идентифицировано по остатку 43: ТАБЛИЦА-US-00035 Jury NGlyc Позиция потенциальный результат соглашения 43 NVTI 0.6713 (9/9) ++ (SEQ ID NO: 7269)

[0370] соответственно изобретение содержит полипептид, содержащий а фрагмент аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 6050, где указано фрагмент содержит участок N-гликозилирования, указанный выше. То изобретение дополнительно содержит полинуклеотид, кодирующий один или несколько из следующих компонентов: полипептиды идентифицированы выше.

[0371] изобретение дополнительно содержит полипептид, содержащий а фрагмент аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 6050, где указанный фрагмент не включает в себя сайт N-гликозилирования, указанный выше. Изобретение включает в себя полинуклеотид, кодирующий такой фрагмент.

[0372] T-эпитопы для SEQ ID NO: 6050 идентифицированы в таблице 24. То изобретение включает в себя полипептид для использования в качестве антигена, причем полипептид содержит: (а) аминокислотную последовательность, выбранную из группы состоящий из последовательностей T-эпитопа, идентифицированных в SEQ ID NOS: 9438-9538; (b) аминокислотная последовательность, имеющая тождественность последовательности к аминокислотная последовательность (а). Изобретение дополнительно содержит полинуклеотидная последовательность, кодирующая полипептиды (а) или (b). То изобретение дополнительно содержит способ выражения или доставки такого выражения полинуклеотиды через вирусные векторы и / или вирусные частицы. То изобретение дополнительно содержит полипептид, содержащий два или более из следующих компонентов: T-эпитопные последовательности, идентифицированные в SEQ ID NOS: 9438-9538, или а полинуклеотид, кодирующий такой полипептид.

[0373] использование в качестве антигена предпочтительно использовать: (1) в качестве T-клетки антиген; (2) для генерирования комплекса между белком МНС класса I (например а class I HLA) и фрагмент указанного антигена; (3) в качестве антигена для повышение клеточно-опосредованного иммунного ответа; и / или (4) в качестве антигена для повышение ответа CTL. Польза предпочтительно защищает или обрабатывает заболевание и / или инфекция, вызванная вирусом SARS. Изобретение обеспечивает применение полипептида в производстве лекарственного средства для иммунизации а млекопитающее (типично человек) против инфекции SARS вирусной где полипептид как определено выше.

[0374] изобретение обеспечивает способ повышения иммунного ответа у человека в условиях искусственного кровообращения. млекопитающее (как правило, человек), включающее в себя этап введения в организм млекопитающее а полипептид, как определено выше, где указанный иммунный ответ представляет собой клеточно-опосредованный иммунный ответ и, предпочтительно, реакция CTL. Иммунная система ответ является предпочтительно защитным или терапевтическим.

[0375] изобретение включает полипептидную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 6051 или его фрагмент, или аминокислотная последовательность, имеющая последовательность тождественность этому. Изобретение включает полипептидную последовательность содержащий SEQ ID NO: 6052 или его фрагмент или аминокислоту последовательность, имеющая к ней идентичность последовательности.

[0376] SEQ ID NO: 6051 и SEQ ID NO: 6052 продемонстрировать функциональные гомология с нуклеокапсидным белком коронавируса. Изобретение включает диагностический набор, содержащий полипептид, содержащий SEQ ID NO: 6051, SEQ ID NO: 6052 или его фрагмент. Изобретение включает в себя: диагностический набор, содержащий полинуклеотид, кодирующий SEQ ID NO: 6051, SEQ ID NO: 6052 или его фрагмент. Изобретение относится к иммуногенным препаратам композиция, содержащая SEQ ID NO: 6051, SEQ ID NO: 6052 или фрагмент из этого. Изобретение включает антитело, которое распознает а полипептид, содержащий SEQ ID NO: 6051, SEQ ID NO: 6052 или фрагмент из этого.

[0377] SEQ ID NO: 6051, как ожидается, будет фосфорилирован в Ser-79; Thr-92; Ser-106; Thr-116; Thr-142; Ser-184; Ser-188; Ser-202; Ser-236; Thr-248; Ser-251; Ser-256; Thr-377. Соответственно, изобретение включает в себя полипептид, содержащий фрагмент SEQ ID NO: 6051, где указанный фрагмент включает один или несколько аминокислотных остатков SEQ ID NO: 6051 выбран из группы, состоящей из Ser-79; Thr-92; Ser-106; Thr-116; Thr-142; Ser-184; Ser-188; Ser-202; Ser-236; Thr-248; Ser-251; Ser-256; Thr-377. Изобретение дополнительно включает полипептид, содержащий фрагмент SEQ ID NO: 6051 где указанный фрагмент не включает в себя один или больше из выпарок аминокислоты SEQ ID нет: 6051 выбранный от группа, состоящая из Ser-79; Thr-92; Ser-106; Thr-116; Thr-142; Ser-184; Ser-188; Ser-202; Ser-236; Thr-248; Ser-251; Ser-256; Thr-377. Два далее полезными фрагментами белка N (например, для иммуноанализа) являются SEQ ID NOS: 9783 & 9784, которые богаты лизином и могут быть использованы для различения вирус атипичной пневмонии от других коронавирусов.

[0378] предсказанные трансмембранные области SEQ ID NO: 6051 идентифицированы ниже. ТАБЛИЦА-США-00036 от к центру счета Внутри к внешним спиралам: 1 найдено 304 (304) 323 (319) 495 312 Снаружи внутрь спиралы: 2 найдено 304 (304) 319 (319) 597 312

[0379] соответственно, изобретение включает полипептид, содержащий а фрагмент SEQ ID NO: 6051 где указанный фрагмент не включает в себя один или больше гидрофобных аминокислотных последовательностей идентифицировано выше. То изобретение также включает в себя полинуклеотидную последовательность, кодирующую любой из над-определенные полипептиды.

[0380] установлена прогнозируемая локализация белка SEQ ID NO: 6051 ниже. SEQ ID NO: 6051, как ожидается, будет локализован вблизи ядра, лизосома (просвет), пространство митохондриальной матрицы и микробное тело (пероксисома). Самый высокий рейтинг-за локализацию вблизи ядра. Коронавирус известно, что нуклеокапсидные белки связываются с вирусной РНК. Коронавирус нуклеокапсидные белки также считаются важными для клеточного опосредования иммунитет. Соответственно, изобретение включает в себя полинуклеотид, содержащий SEQ ID NO: 6051. Изобретение дополнительно включает вирусный вектор или частица, пригодная для доставки in vivo полинуклеотидной последовательности содержащая нуклеокапсидную

полинуклеотидную последовательность вируса ОРВИ или А фрагмент его. В одном варианте осуществления полинуклеотид содержит SEQ ID Нет: 6051 или его фрагмент. Изобретение дополнительно включает способ для выявления клеточно опосредованного иммунного ответа, включающего доставку а полинуклеотид, кодирующий нуклеокапсидный белок вируса ОРВИ или его фрагмент одного к млекопитающему. В одном варианте осуществления полинуклеотид, содержащий SEQ ID нет: 6051 или его фрагмент.

[0381] изобретение дополнительно включает способ экранирования SEQ ID NO: 6051 для ингибитора. Изобретение включает рекомбинантную экспрессию SEQ ID NO: 6051 в основной ячейке. Изобретение включает в себя небольшой молекула которая предотвращает полипептид SEQ ID NO: 6051 от связываться к РНК вируса SARS во время вирусной репликации. Изобретение включает в себя: белок слияния, где указанный белок слияния содержит SEQ ID NO: 6051. Прогнозируемая локализация белка SEQ ID NO: 6051 изложена ниже. ТАБЛИЦА-US-00037 PSORT - - - прогнозирование участков локализации белка версия 6.4 (WWW) Классификация видов: 4 *** Шаг Рассуждения: 1 Предварительный расчет ALOM (порог: 0.5) количество: 0 McG: изучение последовательности сигналов (McGeoch) Длина UR: 3 Пиковое значение UR: 0.19 Чистый заряд CR: 0 Дискриминантный Балл: -15.98 GvH: изучение последовательности сигналов (von Heijne) Оценка Сигнала (-3.5): -6.36 Возможное место расщепления: 58 > > > > > Похоже, что нет N-концевого сигнала seq. Аминокислотный состав прогнозируемой зрелой формы: рассчитано от 1 ALOM new cnt: 0 * * thrshld изменен на -2 Расщепляемый сигнал был обнаружен в ALOM?: 0B ALOM: поиск трансмембранных областей (Klein et al.) количество: 0 значение: 5.04 порог: -2.0 Периферийное правдоподобие = 5.04 модифицированный балл ALOM: -1.91 Молоток: изучение границы митохондриального таргетинга seq. мотив по адресу: 17 PRITFG Дискриминация митохондриальной мишени seq.: отрицательный (-3.97) *** Шаг Рассуждения: 2 Количество KDEL: 0 Контроль аполярного сигнала для внутримитохондриальной сортировки Митохондриальный матрикс? Оценка: 0.10 СКЛ-мотив (сигнал для пероксисомного белка): pos: -1(399), количество: 0 Тенденция состава аминокислоты для пероксисомы: 0.04 Пероксисомные белки? Статус: potclr Оценка AAC (peroxisome): 0.072 Тенденция аминокислотного состава для лизосомальных белков оценка: 0.96 статус: potclr Модифицированная оценка для лизосомы: 0.246 Проверка количества основных остатков (ядра) Проверка схемы остатков 4 для ядерного целеуказания Найдено: pos: 256 (4) KКPR Найдено: pos: 372 (5) KКKK Проверка схемы остатков 7 для ядерного целеуказания Проверка консенсуса Robbins & Dingwall (ядро) Найдено: pos: 372 (3) KК KKTDEAQLP QRQKK Найдено: pos: 373 (3) KК KTDEAQLPQ RQKKQ Итоговый счет Роббинса (ядро): 0.80 Проверка мотива связывания РНК (ядро или цитоплазма) НУК видоизменен. Оценка: 0.90 Состояние ядерного сигнала: положительный (0.90) Проверка мотива СааХ.. Проверка N-миристоилирования.. Проверка мотива СааХ.. ---- окончательный результат ---- ядро-определенность = 0,980 (утвердительно) < succ> лизосома (люмен) - - - определенность = 0,246 (утвердительно) < succ> пространство митохондриальной матрицы - - - определенность = 0,100 (утвердительно) succ> микробное тело (пероксисома) - - - определенность = 0,072 (утвердительно) < succ>

[0382] определены прогнозируемые участки N-гликозилирования SEQ ID NO: 6051 ниже. ТАБЛИЦА-США-00038 Jury NGlyc Позиция потенциальный результат соглашения 48 NNTA 0.6879 (9/9) ++ (SEQ ID NO: 7270) 270 NVTQ 0.7684 (9/9) + + + (SEQ ID NO: 7271)

[0383] ТАБЛИЦА-США-00039 Остаток Нет. Назначение Потенциального Порога Thr 166 0.8547 0.6439 T Thr 367 0,5575 0,5403 T Thr 394 0.8217 0.5821 T

[0384] соответственно изобретение содержит полипептид, содержащий а фрагмент аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 6051, где указано фрагмент содержит один или более из выявленных участков N-гликозилирования выше. Изобретение дополнительно содержит полинуклеотид, кодирующий один или еще больше полипептидов идентифицировано выше.

[0385] изобретение дополнительно содержит полипептид, содержащий а фрагмент аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 6051, где указанный фрагмент не включает один или несколько из выявленных участков N-гликозилирования выше. Изобретение включает в себя полинуклеотид, кодирующий такой фрагмент.

[0386] Т-эпитопы для SEQ ID NO: 6052 идентифицированы в таблице 25. То изобретение включает в себя полипептид для использования в качестве антигена, причем полипептид содержит: (а) аминокислотную последовательность, выбранную из группы состоящий из последовательностей Т-эпитопа, идентифицированных в SEQ ID NOS: 9539-9752; (b) аминокислотная последовательность, имеющая тождественность последовательности с Ан аминокислотная последовательность (а). Изобретение дополнительно содержит а полинуклеотидная последовательность, кодирующая полипептиды (а) или (b). То изобретение дополнительно содержит способ выражения или доставки такого выражения полинуклеотиды через вирусные векторы и / или вирусные частицы. То изобретение дополнительно содержит полипептид, содержащий два или более из следующих компонентов: Т-эпитопные последовательности, идентифицированные в SEQ ID NOS: 9539-9752, или а полинуклеотид, кодирующий такой полипептид.

[0387] вариант SEQ ID NO: 6052, включенный в изобретение is SEQ ID NO: 9964. По сравнению с SEQ ID NO: 6052, эта последовательность имеет 1e на остаток 54 вместо Thr.

[0388] использование в качестве антигена предпочтительно использовать: (1) в качестве Т-клетки антиген; (2) для генерирования комплекса между белком МНС класса I (например а class I HLA) и фрагмент указанного антигена; (3) в качестве антигена для повышение клеточно-опосредованного иммунного ответа; и / или (4) в качестве антигена для повышение ответа CTL. Польза предпочтительно защищает или обрабатывает заболевание и / или инфекция, вызванная вирусом SARS. Изобретение обеспечивает применение полипептида в производстве лекарственного средства для иммунизации а млекопитающее (типично человек) против инфекции SARS вирусной где полипептид как определено выше.

[0389] в изобретении предложен способ повышения иммунного ответа у человека в условиях искусственного кровообращения. млекопитающее (как правило, человек), включающее в себя этап введения в организм млекопитающее а полипептид, как определено выше, где указанный иммунный ответ представляет собой клеточно-опосредованный иммунный ответ и, предпочтительно, реакция CTL. Иммунная система ответ является предпочтительно защитным или терапевтическим.

[0390] изобретение включает композицию, содержащую вирус SARS белок нуклеокапсида или его фрагмент и далее содержащий атипичную пневмонию белок вирусной мембраны или его фрагмент. Композиция может быть дополнительно содержит один или несколько адъювантов, обсуждаемых ниже.

[0391] изобретение дополнительно включает композицию, содержащую а полипептид, содержащий SEQ ID NO: 6051 или его фрагмент, или а последовательность, имеющая идентичность последовательности к ней и далее содержащая а полипептид, содержащий SEQ ID NO: 6040, или его фрагмент, или а последовательность, имеющая к ней идентичность последовательности. Такая композиция может быть использована, например, в вакцине. Такая композиция может дополнительно содержать один или дополнительные адъюванты обсуждаются ниже.

[0392] изобретение включает композицию, содержащую вирус SARS белок нуклеокапсида или его фрагмент и спайковый белок вируса ОРВИ или его фрагмент. В одном варианте осуществления нуклеокапсидный белок содержит полипептидную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 6051 или его фрагмент одной или последовательности, имеющая к ней тождественность последовательности. Одновременно вариант осуществления, спайковый белок содержит полинуклеотид, содержащий SEQ ID NO: 6042 или его фрагмент или последовательность, имеющая идентификатор последовательности к этому. Состав может дополнительно включать один или несколько из следующих компонентов: адъюванты обсуждаются ниже.

[0393] изобретение дополнительно включает композицию, содержащую антитела специфичный к вирусу ОРВИ нуклеокапсидный белок и содержащий антитела специфический к белку шипа вируса атипичной пневмонии. В одном варианте осуществления антитело является специфичный к нуклеокапсидному белку содержит полипептидную последовательность содержащий SEQ ID NO: 6051 или его фрагмент или последовательность, имеющую последовательность тождественна ей. В одном варианте осуществления антитело является специфичным к спайку белка относится полинуклеотид, содержащий SEQ ID NO: 6042 или его фрагмент, или последовательность, имеющая идентичность последовательности к нему.

[0394] изобретение дополнительно включает полинуклеотидные последовательности, и их фрагменты, из вируса атипичной пневмонии, которые сохраняются среди таким образом кодируются коронавируса и полипептиды. Такие сохраненные последовательности может быть идентифицирован в трасс, показанных на фиг. 7. Такие консервы последовательности могут быть использованы в вакцинах данного изобретения или в диагностические реагенты, наборы и способы изобретения.

[0395] изобретение дополнительно включает полинуклеотидные последовательности, и их фрагменты, из вируса атипичной пневмонии, которые специфичны для вируса атипичной пневмонии и не делится с коронавирусами. Такие специфические последовательности SARS также являются идентифицированы как SEQ ID NOS: 6040, 6043, 6044, 6047, 6048, 6049 и 6050. Такие специфические последовательности SARS могут быть использованы в вакцинах изобретения или в диагностических реактивах, наборах и способах изобретения.

[0396] изобретение также включает полинуклеотидные последовательности, которые могут быть используемые в качестве зондов или праймеров для диагностических реагентов, наборы (содержащие такие реагенты) и методы которые можно использовать для того чтобы диагностировать или определить наличие или отсутствие вируса ОРВИ в биологическом образце. Изобретение включает в себя полинуклеотидную последовательность, содержащую один или несколько праймеров последовательности, идентифицированные в SEQ ID NOS: 6076-6265 (Таблица 5). Изобретение далее включает в себя полинуклеотидную последовательность, содержащую комплемент одного или несколько последовательностей праймеров, идентифицированных в SEQ ID NOS: 6076-6265.

[0397] изобретение также включает полинуклеотидные последовательности, которые могут быть используемые в качестве зондов или праймеров для диагностических реагентов, наборы (содержащие такие реагенты) и методы которые можно использовать для того чтобы диагностировать или определить наличие или отсутствие вируса ОРВИ в биологическом образце. Изобретение включает в себя полинуклеотидную последовательность, содержащую один или несколько праймеров последовательности, идентифицированные в SEQ ID NOS: 6266-6343 (Таблица 6). Изобретение далее включает в себя полинуклеотидную последовательность, содержащую комплемент одного или несколько последовательностей праймеров, идентифицированных в SEQ ID NOS: 6266-6343.

[0398] изобретение также включает полинуклеотидные последовательности, которые могут быть используемые в качестве зондов или праймеров для диагностических реагентов, наборы (содержащие такие реагенты) и методы которые можно использовать для того чтобы диагностировать или определить наличие или отсутствие вируса ОРВИ в биологическом образце. Изобретение включает в себя полинуклеотидную последовательность, содержащую один или несколько праймеров последовательности, идентифицированные в SEQ ID NOS: 6344-6392 (Таблица 7). Изобретение далее включает в себя полинуклеотидную последовательность, содержащую комплемент одного или несколько последовательностей праймеров, идентифицированных в SEQ ID NOS: 6344-6392.

[0399] изобретение также включает полинуклеотидные последовательности, которые могут быть используемые в качестве зондов или праймеров для диагностических реагентов, наборы (содержащие такие реагенты) и методы которые можно использовать для того чтобы диагностировать или определить наличие или отсутствие вируса ОРВИ в биологическом образце. Изобретение включает в себя полинуклеотидную последовательность, содержащую один или несколько праймеров последовательности, идентифицированные в SEQ ID NOS: 6393-6559 (таблицы 8 и 9). То изобретение дополнительно включает полинуклеотидную последовательность, содержащую дополнение одной или нескольких последовательностей праймеров, идентифицированных в SEQ ID Номер телефона: 6393-6559.

[0400] изобретение также включает полинуклеотидные последовательности, которые могут быть используемые в качестве зондов или праймеров для диагностических реагентов, наборы (содержащие такие реагенты) и методы которые можно использовать для того чтобы диагностировать или определить наличие или отсутствие вируса ОРВИ в биологическом образце. Изобретение включает в себя полинуклеотидную последовательность, содержащую один или несколько праймеров последовательности, идентифицированные в SEQ ID NOS: 6560-6568. Изобретение далее включает в себя полинуклеотидную последовательность, содержащую комплемент одного или несколько последовательностей праймеров, идентифицированных в SEQ ID NOS: 6560-6568.

[0401] изобретение включает полипептидную последовательность, содержащую любую из них четного номера SEQ ID NOS: 7272-7290, или его фрагмент, или а последовательность, имеющая к ней идентичность последовательности. Изобретение дополнительно включает в себя полинуклеотидная последовательность, кодирующая любой из четных номеров SEQ ID NOS: 7272-7290, или их фрагмент, или последовательность, имеющая идентификацию последовательности к этому. Примерами таких полинуклеотидных последовательностей являются нечетные SEQ ИДЕНТИФИКАЦИОННЫЙ НОМЕР: 7273-7291.

[0402] изобретение включает полинуклеотидную последовательность, содержащую интергенетическая последовательность, которая является общей для каждого открытого кадра считывания вирус SARS. Считается, что вирус SARS использует эту последовательность для подачи сигнала перевод открытой рамки для чтения. Межпородная последовательность состоит из 10 мер SEQ ID NO: 7292, или необязательно шестигранник SEQ ID NO: 7293. Когда вирус транскрибирует свою положительную (+) нить РНК в (-) нить РНК, то структура репликации вируса использует шаблон (-) strand для транскрибирования нуклеотиды на 5' конце до первой межполовой последовательности, далее следует межгеновая последовательность, за которой следуют выбранные открытые рамки считывания. Затем вирус создает несколько мРНК, состоящих из 5' конец, межпоколенная последовательность и последовательность кодирования. Для получения более подробной информации о Репликация Nidovirales (включая коронавирус) см. например, Ziebuhr et al., "Вирусно-кодируемые протеиназы и протеолитическая обработка в организме Нидовиралес", журнал общей вирусологии 81: 853-879 (2000), incorporated здесь по ссылке в полном объеме.

[0403] изобретение, содержащее полинуклеотидную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 7292 или его дополнение. Изобретение содержит а полинуклеотидная последовательность, содержащая SEQ ID NO: 7293 или комплемент из этого. Изобретение дополнительно содержит полинуклеотидную последовательность содержащий нуклеотиды из 5' конца вирусного генома SARS, или его обратный комплемент, и далее содержащий межгеновую последовательность или ее обратное дополнение. Полинуклеотид может дополнительно содержать один или более от вируса торс открываются рамки для чтения. Примеры полинуклеотидов последовательности, содержащие нуклеотиды из 5' конца генома вируса торс за межгеновой последовательностью следуют SEQ ID NOS: 7294-7301.

[0404] изобретение включает полинуклеотидную последовательность, содержащую а последовательность, выбранная из группы, состоящей из SEQ ID NO: 7292, SEQ ID NO: 7293, SEQ ID NO: 7294, SEQ ID NO: 7295, SEQ ID NO: 7296, SEQ ID NO: 7297, SEQ ID NO: 7298, SEQ ID NO: 7299, SEQ ID NO: 7300 и SEQ ID NO: 7301, или его фрагмент, или последовательность, имеющая идентификацию последовательности к этому. В одном варианте осуществления полинуклеотид не состоит полностью из известной последовательности вируса атипичной пневмонии.

[0405] межгеновая последовательность вируса атипичной пневмонии может быть использована для создания RNAi молекула. Такую молекулу RNAi вируса SARS специфическую можно использовать для того чтобы обработать Вирусная инфекция торс. Изобретение включает молекулу RNAi, содержащую а двухцепочечная молекула РНК, в которой одна нить РНК содержит последовательность выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NO: 7292, SEQ ID NO: 7293, SEQ ID NO: 7294, SEQ ID NO: 7295, SEQ ID NO: 7296, SEQ ID NO: 7297, SEQ ID NO: 7298, SEQ ID NO: 7299, SEQ ID NO: 7300 и SEQ ID NO: 7301, или а фрагмент его. Предпочтительно, чтобы указанная нить РНК содержала последовательность выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NO: 7292 и SEQ ID NO: 7293. Предпочтительно, чтобы другая нить РНК содержала обратный комплемент из первой нити или полинуклеотидной последовательности, которая гибридизуется с первая прядя.

[0406] изобретение включает применение RNAi в способе лечения при вирусной инфекции ОРВИ, включающей введение млекопитающему Ан эффективное количество молекулы РНК Си. Предпочтительно, молекула RNAi содержит молекулу, описанную выше. Дальнейшее обсуждение RNAi применение межпородной последовательности включено в раздел IV спецификация ниже.

[0407] изобретение также включает применение антисмысла вируса ОРВИ нуклеотидная последовательность, предпочтительно антисмысловая, направленная на вирус ОРВИ межпородная последовательность. Такая антисмысловая последовательность может быть использована в лечение субъекта, инфицированного вирусом ОРВИ. Антисмысл этого Межгеновая последовательность вируса атипичной пневмонии может быть разработана для связывания с вирусом атипичной пневмонии полинуклеотиды, блокирующие доступ вирусной репликационной машины к межпородная последовательность. Такая антисмысловая последовательность также может быть использована для определить наличие или отсутствие вируса ОРВИ в биологическом образце. Антисенсор сам по себе может быть помечен или антисмысл, связанный с вирусные полинуклеотиды могут быть обнаружены с помощью известных в искусстве средств.

[0408] антисмысловые нуклеиновые кислоты специально предназначены для связывания с РНК, приводящ в образовании гибридов РНК-ДНК или РНК-РНК, с арестом репликации ДНК, обратной транскрипции или трансляции рибонуклеиновой кислоты посылного. Антисмысловые полинуклеотиды, основанные на выбранной последовательности, могут мешать экспрессии соответствующего гена. Антисмысловые полинуклеотиды будут связываться и / или мешают переводу соответствующей мРНК.

[0409] изобретение также включает использование межполушарной области с рибозим.

[0410] Транс-расщепляющие каталитические РНК (рибозимы) - это молекулы РНК обладающий эндорибонуклеазной активностью. Рибозимы специально разработаны для конкретного целевого объекта, и целевое сообщение должно содержать определенный нуклеотидная последовательность. Они проектированы для того чтобы расщепить любой вид РНК сайт-конкретно на фоне клеточной РНК. Событие расщепления делает мРНК нестабильной и предотвращает экспрессию белка. Важно, рибозимы могут быть использованы для ингибирования экспрессии гена неизвестной функции с целью определения его функции in vitro или in vivo контекст, путем обнаружения фенотипического эффекта.

[0411] одним из широко используемых рибозимных мотивов является hammerhead, для которого требования к последовательности субстрата минимальны. Конструкция головки молотка рибозим раскрыт в Usman et al., Текущий ОПИН. Структур. БИОЛЬ. (1996) 6:527-533. Усман также обсуждает терапевтическое использование рибозимов. Рибозимы также могут быть приготовлены и использованы, как описано в Long et al., FASEB J. (1993) 7:25; Symons, Ann. Преподобный Биохим. (1992) 61:641; Perrotta и др., Биохимия. (1992) 31:16-17; Ojwang et al., Процесс. Натл. Акад. Sci. (США) (1992) 89:10802-10806; и США Пат. № 5.254.678. Рибозим расщепление РНК ВИЧ-1 описано в патенте США. № 5,144,019; методы проведения расщепление РНК с использованием рибозимов описано в патенте США. № 5,116,742; и методы повышения специфичности рибозимов описаны в США. Похлопывать. № 5,225,337 и Коидзуми и др., Nucleic Acid Res. (1989) 17:7059-7071. Получение и применение фрагментов рибозима в головке молота структура также описаны Koizumi и др., Nucleic Acids Res. (1989) 17:7059-7071. Подготовка и применение фрагментов рибозима в шпильке для волос структура описана Chowrira & Burke, Nucleic Acids Res. (1992) 20:2835. Рибозимы также могут быть сделаны путем прокатки транскрипции, как описано в городе Daubendiek & Kool, Nat. Биотехнол. (1997) 15(3):273-277.

[0412] гибридирующая область рибозима может быть модифицирована или может быть изменена приготовлено в виде разветвленной структуры, как описано в Horn & Urdea, нуклеиновой Acids Res. (1989) 17:6959-67. Основная структура рибозимов может также будте химически изменены способами, знакомыми тем, кто владеет этим искусством, а химически синтезированные рибозимы можно вводить как синтетические олигонуклеотидные производные, модифицированные мономерными единицами. В терапевтическом случае контекст, липосомальная опосредованная доставка рибозимов улучшает клеточную активность поглощение, как описано в Birikh et al., Евро. J. Biochem. (1997) 245:1-16.

[0413] терапевтические и функциональные геномные применения рибозимов приступайте, начиная со знания части кодирующей последовательности из ген, который нужно ингибировать. В настоящем изобретении определена целевая последовательность предпочтительно содержит межпородную последовательность вируса торс. Предпочтительно, последовательность выбирается из группы, состоящей из SEQ ID NO: 7292 и SEQ ID NO: 7293. Целевой участок расщепления выбирается в поле последовательность цели, и рибозим построены основанный на 5' и 3' нуклеотидные последовательности, расположенные по бокам от места расщепления. Предпочтительно, 5' нуклеотидная последовательность включает в себя 5' непереуведенную область SARS вирус. Затем рибозим может быть дополнительно сконструирован из одного или нескольких полинуклеотидные последовательности, выбранные из группы, состоящей из SEQ ID NO: 7294, SEQ ID NO: 7295, SEQ ID NO: 7296, SEQ ID NO: 7297, SEQ ID NO: 7298, SEQ ID NO: 7299, SEQ ID NO: 7300 и SEQ ID NO: 7301.

[0414] Антисмысловое лечение ВИЧ-инфекции описано ниже ссылки, каждая из которых включена в настоящем документе по ссылке в их целостность. (антисмысловая РНК, комплементарная к мРНК gag, tat, rev, env) (Sezakiel et al., 1991, J. Virol. 65: 468-472; Chatterjee et al., 1992, Science 258: 1485-1488; Rhodes et al., 1990, J. Gen. Virol. 71:1965. Rhodes et al., 1991, СПИД 5: 145-151; Sezakiel et al., 1992, J. Virol. 66:5576-5581; Джоши и др., 1991, J. Virol. 65:5524-5530).

[0415] изобретение включает использование заманивающей РНК для разрушения атипичной пневмонии репликация вирусов и жизненный цикл. Способы изготовления и использования такой приманки РНК для лечения вирусной инфекции известны в ст. То изобретение включает в себя доставку генов, кодирующих, например, ОРВИ межгеновая последовательность вируса, к зараженным клеткам. Предпочтительно, последовательность содержит одну или несколько последовательностей, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 7292, SEQ ID NO: 7293, SEQ ID NO: 7294, SEQ ID NO: 7295, SEQ ID NO: 7296, SEQ ID NO: 7297, SEQ ID NO: 7298, SEQ ID NO: 7299, SEQ ID NO: 7300 и SEQ ID NO: 7301. Предпочтительно, чтобы последовательность состояла из одного или нескольких последовательностей, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 7292 и SEQ ID NO: 7293. Предпочтительно, чтобы последовательность состояла из SEQ ID NO: 7293.

[0416] в настоящем изобретении доставка межгеновой последовательности, которая является не связан с вирусом SARS открытые рамки для чтения нарушает перевод процесс вирусной РНК и уменьшает продукцию протеинов пробирки. Описаны аналогичные методы лечения ВИЧ-вирусной инфекции. В следующих ссылках обсуждается использование приманки РНК ВИЧ TAR или RRE для лечения ВИЧ-инфекции. Каждая из этих ссылок включена здесь по ссылке в полном объеме. (Sullenger et al., 1990, сотовый 63:601-608; Sullenger et al., 1991, J. Virol. 65:6811-6816; Lisziewicz et Аль., 1993, New Biol. 3: 82-89; Lee et al., 1994, J. Virol. 68:8254-8264), рибозимы (Sarver et al., 1990, Science 247:1222-1225; Wecrasinghe et Аль., 1991, J. Virol. 65: 5531-5534; Dropulic et al., 1992, J. Virol. 66:1432-1441; Ojwang et al., 1992, Proc. Натл. Акад. Sci. США. 89: 10802-10806; Yu et al., 1993, Proc. Натл. Акад. Sci. США. 90: 6340-6344; Yu et al., 1995, Proc. Натл. Акад. Sci. США. 92:699-703; Ямада и др., 1994, Gene Therapy 1: 38-45).

[0417] изобретение включает применение интергенного вируса ОРВИ последовательность в диагностических реагентах, наборы (содержащие такие реагенты) и методы, которые могут быть использованы для диагностики или определения наличия или отсутствия о вирусе торс в биологическом образце. Такие диагностические реагенты, наборы, и методы далее обсуждаются в разделе II спецификации.

[0418] изобретение включает пару праймеров для усиления атипичной пневмонии полинуклеотидная последовательность, содержащая (i) первый праймер, содержащий а последовательность, которая по существу идентична части последовательности выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NO: 7292, SEQ ID NO: 7293, SEQ ID NO: 7294, SEQ ID NO: 7295, SEQ ID NO: 7296, SEQ ID NO: 7297, SEQ ID NO: 7298, SEQ ID NO: 7299, SEQ ID NO: 7300 и SEQ ID NO: 7301 и (ii) второй праймер, содержащий последовательность, которая по существу является комплементарно к части последовательности выбранной от группы состоит из последовательности SEQ ID NO: 1 и последовательности SEQ ID NO: 2, таким образом, что пара праймеров (i) и (ii) определяет последовательность шаблонов внутри последовательность из группы, состоящей из последовательности SEQ ID NO: 1 и последовательность SEQ ID NO: 2. Предпочтительно, чтобы первый праймер (i) содержал а последовательность, которая по существу идентична части последовательности выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NO: 7292 и SEQ ID NO: 7293. Предпочтительно, чтобы первый праймер (i) содержал последовательность, которая является по существу идентична части последовательности SEQ ID NO: 7293. Предпочтительно ампликон, определенный указанными первым и вторым праймерами от 50 до 250 нуклеотидов в длину. Праймеры могут выборочно быть маркировка для облегчения их обнаружения. Способы и композиции для использования в маркировке грунтовок рассматриваются далее в приложении в разделе III.

[0419] изобретение дополнительно включает пару праймеров для усиления а Полинуклеотидная последовательность SARS, содержащая (i) первый праймер, содержащий а последовательность которая существенно идентична к части дополнения части последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 7292, SEQ ID NO: 7293, SEQ ID NO: 7294, SEQ ID NO: 7295, SEQ ID NO: 7296, SEQ ID NO: 7297, SEQ ID NO: 7298, SEQ ID NO: 7299, SEQ ID NO: 7300 и SEQ ID NO: 7301 и (ii) второй праймер, содержащий последовательность, которая существенно дополняет собой часть комплемента а последовательность, выбранная из группы, состоящей из последовательности SEQ ID NO: 1 и последовательность SEQ ID NO: 2, такая что пара праймеров определяет а последовательность шаблонов внутри последовательности, выбранной из группы, состоящей из последовательность SEQ ID NO: 1 и последовательность SEQ ID NO: 2. Ампликон определенный этими первыми и вторыми праймерами предпочтительно между 50 и 250 нуклеотиды в длину. Праймеры могут выборочно быть обозначены в длину. Способы и композиции для использования в маркировке грунтовок обсуждаются далее в заявке в разделе III.

[0420] изобретение включает набор, содержащий (i) первый праймер, содержащий последовательность, которая по существу идентична части а последовательность, выбранная из группы, состоящей из SEQ ID NO: 7292, SEQ ID NO: 7293, SEQ ID NO: 7294, SEQ ID NO: 7295, SEQ ID NO: 7296, SEQ ID NO: 7297, SEQ ID NO: 7298, SEQ ID NO: 7299, SEQ ID NO: 7300 и SEQ ID NO: 7301 и (ii) второй праймер, содержащий последовательность, которая является существенно дополняет часть последовательности, выбранную из группы, состоящая из последовательности SEQ ID NO: 1 и последовательности SEQ ID NO: 2, такие что пара праймеров (i) и (ii) определяет последовательности шаблонов в пределах последовательности из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1 и SEQ ID Нет: 2. Предпочтительно, чтобы первый праймер (i) содержал последовательность, которая является по существу идентично к части последовательности выбранной от группа, состоящая из SEQ ID NO: 7292 и SEQ ID NO: 7293. Желательно, чтобы (i) первый праймер содержит последовательность, которая по существу идентична часть последовательности SEQ ID NO: 7293. Праймеры могут выборочно быть помечены, чтобы облегчить их обнаружение. Способы и композиции для польза в обозначая праймерах обсуждена более далее в применении внутри раздел III.

[0421] другие предпочтительные комплекты включают (i) первый праймер, содержащий а последовательность которая существенно идентична к части дополнения части последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 7292, SEQ ID NO: 7293, SEQ ID NO: 7294, SEQ ID NO: 7295, SEQ ID NO: 7296, SEQ ID NO: 7297, SEQ ID NO: 7298, SEQ ID NO: 7299, SEQ ID NO: 7300 и SEQ ID NO: 7301 и (ii) второй праймер, содержащий последовательность, которая существенно дополняет собой часть комплемента а последовательность, выбранная из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1 и SEQ ID Нет: 2, так что пара праймеров определяет последовательность шаблонов в пределах а последовательность, выбранная из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1 и SEQ ID Нет: 2.

[0422] изобретение дополнительно включает аттенуированный вирус SARS для использования в качестве вакцина, в которой межпородная область была мутирована для уменьшения экспрессия вирусных структурных или неструктурных белков. То аттенуированный вирус ОРВИ может содержать одно или несколько дополнений, удалений или инсерция в одну или несколько межполовых областей вирусного генома. Предпочтительно, чтобы аттенуированный вирус SARS включал добавление, удаление или вставка в один или несколько вхождений последовательности, выбранной из списка группа, состоящая из SEQ ID NO: 7292 и SEQ ID NO: 7293. Желательно, чтобы добавление, удаление или вставка происходит в одном или нескольких экземплярах SEQ ID NO: 7293.

[0423] изобретение дополнительно содержит малую молекулу, которая ингибирует связывание или ассоциация вирусного механизма репликации SARS, такого как а рибонуклеопротеин, с межполовой областью вирусного генома. Предпочтительно, малая молекула блокирует вязку или ассоциацию Вирусные машины SARS с последовательностью, выбранной из группы, состоящей SEQ ID NO: 7292 и SEQ ID NO: 7293. Предпочтительно, маленькая молекула inhibits связывание или ассоциация вирусного механизма SARS с SEQ ID Нет: 7293. Изобретение дополнительно включает способ скрининга на а малая молекула для лечения вирусной инфекции SARS, содержащая применение assay для того чтобы определить небольшую молекулу которая мешает с Ассоциацией вирусного механизма репликации атипичной пневмонии с межполовой областью Вирусный геном SARS.

[0424] изобретение дополнительно обеспечивает новый ПОЛИНУКЛЕОТИД SARS последовательность SEQ ID NO: 9968. Все шесть кадров для чтения этой последовательности 690 мер показаны на фиг. 113. Составные аминокислотные последовательности из фиг. 113, имеющ хотя бы 4 аминокислоты, перечислены как No ID SEQ: 9969 к 10032.

[0425] соответственно изобретение включает полинуклеотидную последовательность состоит из SEQ ID NO: 9968. Он также обеспечивает последовательности полинуклеотида имея идентификатор последовательности для SEQ ID NO: 9968. Степень последовательности идентичность предпочтительно превышает 50% (например, 60%, 70%, 80%, 85%, 88%, 90%, 92%, 95%, 99% или даже больше).

[0426] изобретение включает аминокислотную последовательность, кодируемую по формуле полинуклеотидная последовательность SEQ ID NO: 9968, включая аминокислоту последовательности, выбранные из группы, состоящей из SEQ ID NO.отхлебывать.S: 9969 to 10032. Предпочтительно, последовательность аминокислоты состоит из SEQ ID NO: 9997 или содержит SEQ ID NO: 9998.

[0427] изобретение также обеспечивает аминокислотные последовательности, имеющие последовательность идентичность аминокислотной последовательности, кодируемой SEQ ID NO: 9968. То изобретение обеспечивает аминокислоты, имеющие идентичность последовательности к аминокислоте последовательность, выбранная из группы, состоящей из SEQ ID NO.отхлебывать.S: 9969 to 10032. Степень идентичности последовательности предпочтительно больше 50% (например, 60%, 70%, 80%, 85%, 88%, 90%, 92%, 95%, 99% или даже больше).

[0428] часть SEQ ID NO: 9968 соответствует приблизительно 98% идентичность ранее опубликованной последовательности полинуклеотидов SARS, обычно упоминается как " BNI-1 " (SEQ ID NO: 10033). BNI-1 был секвенирован на Институт тропической медицины им. Бернхарда Нохта, Национальный справочный центр для тропических инфекционных заболеваний в городе Гамбург, Германия. Последовательность BNI-1 была опубликована на веб-сайте ВОЗ в апреле. 4, 2003 at <http://www.who.int/csr/sars/primers/en> и в Dorsten et al., "Идентификация нового коронавируса у пациентов с тяжелой острой формой заболевания Респираторный синдром", New England Journal of Medicine, опубликовано на сайте At <http://www.nejm.org> на апрель. 10, 2003. Обе ссылки включены здесь по ссылке в полном объеме. Шесть рамок для чтения этого 302 последовательность мер показана на фиг. 114 (см. Также рис. 129). Учредитель аминокислотные последовательности из фиг. 114, имеющие по крайней мере 4 аминокислоты, являются указан как SEQ ID NO.SUB.S: от 10034 до 10065. Выравнивание SEQ ID нет: 10034 с SEQ ID NO: 9997 показано на фиг. 130.

[0429] изобретение обеспечивает получение полинуклеотидных последовательностей, содержащих фрагменты SEQ ID NO: 9968. В одном варианте осуществления фрагмента нет состоят полностью из SEQ ID NO: 10033 или известного коронавируса.

[0430] изобретение обеспечивает аминокислотные последовательности, содержащие фрагменты аминокислотной последовательности, кодируемой SEQ ID NO: 9968. Одновременно вариант осуществления, фрагмент не состоит полностью из аминокислоты последовательность, кодируемая SEQ ID NO: 10033 или известным коронавирусом.

[0431] изобретение обеспечивает получение аминокислот, содержащих фрагменты Ан аминокислотная последовательность, выбранная из группы, состоящей из SEQ ID Нет.отхлебывать.S: от 9969 до 10032. В одном варианте исполнения фрагмент не состоит полностью аминокислотной последовательности, кодируемой полинуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 10033 или известный коронавирус.

[0432] приблизительно 100 нуклеотидов на 5 ' конце SEQ ID NO: 9968 do не соответствует ни одной части полинуклеотидной последовательности BNI-1 (SEQ ID NO: 10033). Эта непревзойденная часть изложена как SEQ ID NO: 10066. То изобретение таким образом дополнительно обеспечивает полинуклеотид, содержащий последовательность содержащий SEQ ID NO: 10066, полинуклеотидные последовательности, имеющие последовательность идентичность SEQ ID NO: 10066, или полинуклеотидные последовательности, содержащие фрагменты SEQ ID NO: 10066.

[0433] изобретение дополнительно содержит аминокислотную последовательность, закодированную посредством SEQ ID NO: 10066, аминокислотная последовательность, имеющая идентичность последовательности к аминокислотная последовательность, кодируемая SEQ ID NO: 10066, или аминокислота последовательность, содержащая фрагменты аминокислотной последовательности, кодируемой SEQ ID Нет: 10066. Предпочтительно, аминокислотная последовательность содержит SEQ ID NO: 10067.

[0434] SEQ ID NO: 9997/9998 демонстрирует гомологию с областью а pol 1ab нескольких коронавирусов. ИНЖИР. 115 показывает выравнивание SEQ ID Нет.отхлебывать.S: 9997/9998 к аминокислотным последовательностям для pol 1ab крупного рогатого скота коронавирус (SEQ ID NO: 10068), вирус инфекционного бронхита птиц (SEQ ID NO: 10069) и вирус гепатита мышей (SEQ ID NO: 10070). Единодушие аминокислотная последовательность SEQ ID нет.отхлебывать.S: 9997/9998, SEQ ID NO: 10068, SEQ ID NO: 10069, и SEQ ID NO: 10070 показано в нижней строке выравнивание на фиг. 115 (например SEQ ID NO: 10071).

[0435] как показано на фиг. 113, полинуклеотидная последовательность, кодирующая SEQ ID Нет: 9997 имеет стоп-кодон после кодона 205, между SEQ ID NO.отхлебывать.S: 9997 и еще 9998. По желанию, стоп-кодон может быть удален и аминокислота последовательность продолжается (SEQ ID NO: 10072). Соответственно, изобретение обеспечивает аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 9997 и / или SEQ ID NO: 9998, или

SEQ ID NO: 10072, а также дополнительно содержит аминокислоту последовательность, кодирующая С-концевой участок гена Pol 1ab коронавируса или а фрагмент его.

[0436] как показано на фиг. 115, SEQ ID NO.отхлебывать.S: 10068, 10069, 10070 и 10071 содержат аминокислоты до n-конца SEQ ID NO: 9997. То изобретение также предусматривает аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 9997 и далее содержащий аминокислотную последовательность, кодирующую для N-конечная точка белка коронавируса pol1ab или его фрагмента.

[0437] последовательности pol1ab на фиг. 115 содержат указанную область кодирования на схематическом изображении фиг. 117 через "*" на рисунке. 115, начало этого геномная область обозначается стрелкой скрещивания перед аминокислотой 6080 из последовательности консенсуса SEQ ID NO: 10071. Конец этого генома область обозначается стрелкой, пересекающей перед аминокислотой 6604 из последовательности консенсуса. Изобретение обеспечивает аминокислотную последовательность состоит из SEQ ID NO: 9997 и / или SEQ ID NO: 9998, или SEQ ID NO: 10072, и более далее содержащий первую аминокислотную последовательность до N-terminus сказал SEQ ID NO: 9997 и / или SEQ ID NO: 9998, или SEQ ID NO: 10072, где указанная первая аминокислотная последовательность имеет гомологию с N-концевой последовательностью известный коронавирусный белок pol 1ab " * " или его фрагмент.

[0438] изобретение дополнительно обеспечивает аминокислотную последовательность состоит из SEQ ID NO: 9997 и SEQ ID NO: 9998, где стоп-кодон после того, как SEQ ID NO: 9971 будет удален (т. е. SEQ ID NO: 10072), и далее содержит вторую аминокислотную последовательность, следующую за концом С SEQ ID NO: 9998, где указанная вторая аминокислотная последовательность гомологична с а С конечная точка известного коронавирусного белка pol 1ab " * " или его фрагмента из этого.

[0439] примеры таких белков приведены на рис.1. 118, и являются SEQ ID HET.отхлебывать.S: от 10073 до 10077. SEQ ID NO: 10073 содержит SEQ ID NO: 9997 и более добавочно содержит аминокислоты до n-terminus и вслед за С-концом из белка pol 1ab " * " птицы вирус инфекционного бронхита. SEQ ID NO: 10074 содержит SEQ ID NO: 9997 и более добавочно содержит аминокислоты до n-terminus и последующий к С-терминали от белка pol1ab " * " коронавируса крупного рогатого скота. СЛЕД. ID NO: 10075 содержит SEQ ID NO: 9997 и далее содержит аминокислоты до N-концевой точки и после С-концевой точки от pol 1ab "*"белок вируса гепатита мышей. SEQ ID NO: 10076 содержит SEQ ID Нет: 9997 и более добавочно содержит аминокислоты до n-terminus и вслед за С-концом из консенсуса белка pol1ab "*" вируса птичьего инфекционного бронхита, коронавируса крупного рогатого скота и мышей вирус гепатита (рис. 115). SEQ ID NO: 10077 содержит консенсус последовательность SEQ ID NOS: от 10073 до 10076.

[0440] изобретение содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группа, состоящая из SEQ ID NO.отхлебывать.S: 10073, 10074, 10075, 10076 и 10077. Изобретение дополнительно включает аминокислотную последовательность, содержащую фрагменты аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID HET.отхлебывать.S: 10073, 10074, 10075, 10076 и 10077. Изобретение более потом содержит последовательность аминокислоты с идентичностью последовательности к а последовательность, выбранная из группы, состоящей из SEQ ID NO.отхлебывать.S: 10073, 10074, 10075, 10076 и 10077.

[0441] изобретение содержит полинуклеотиды, кодирующие аминокислотные последовательности, выбранные из группы, состоящей из SEQ ID NO.отхлебывать.S: 10073, 10074, 10075, 10076 и 10077. Изобретение содержит: полинуклеотиды, имеющие идентичность последовательности для кодирования полинуклеотидов аминокислотные последовательности, выбранные из группы, состоящей из SEQ ID HET.отхлебывать.S: 10073, 10074, 10075, 10076 и 10077. Изобретение содержит: фрагменты полинуклеотидов, кодирующих SEQ ID NO.отхлебывать.S: 10073, 10074, 10075, 10076 и 10077.

[0442] как показано на фиг. 113, SEQ ID NO: 9968 включает последовательность, которая кодирует SEQ ID NO: 10020 с последующим стоп-кодом, дающим С-терминал остаток треонина (Thr). Соответствующая последовательность из аминокислоты последовательность, кодируемая BNI-1, является SEQ ID NO: 10078, который продолжается после С-terminus SEQ ID NO: 10020. Соответственно, изобретение включает в себя белок, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10020 или аминокислоту последовательность, имеющая идентичность последовательности к SEQ ID NO: 10020 или аминокислоте последовательности, содержащая фрагмент SEQ ID NO: 10020, где С-концевой остаток указанного белка представляет собой треонин. Желательно, чтобы С-концевой участок указанного белка является-СТ. еще более предпочтительно, с-концевой участок из указанного белка есть-EST. Изобретение также включает белок, содержащий последовательность аминокислоты SEQ ID нет: 10078 или последовательность аминокислоты имея идентификация последовательности к SEQ ID NO: 10078 или последовательность аминокислоты содержащий фрагмент SEQ ID NO: 10078, где с-концевой остаток из указанного белка выделяют Thr. Предпочтительно, С-концевая часть указанного белка является Еще более предпочтительно, чтобы С-концевой участок указанного белка был-EST.

[0443] SEQ ID NO: 9968 также кодирует последовательность аминокислот 54 mer SEQ ID Нет: 10015. Полинуклеотид, кодирующий SEQ ID NO: 10015 кодирует две остановки кодоны на его С-конце (рис. 113). Соответствующий регион из списка Последовательность BNI-1 не содержит это 54 mer. Соответственно, изобретение включает протеин состоя из последовательности аминокислоты SEQ ID NO: 10015, или аминокислотная последовательность, имеющая идентичность последовательности SEQ ID NO: 10015 или an аминокислотная последовательность, содержащая фрагмент SEQ ID NO: 10015. То изобретение дополнительно включает полипептид, содержащий SEQ ID NO: 10015 и более потом содержащ первую последовательность аминокислоты до n-terminus SEQ ID NO: 10015.

[0444] SEQ ID NO: 9968 кодирует аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9969. Полинуклеотидная последовательность содержит стоп-кодон на С-концевом участке SEQ ID NO: 9969. Соответственно, изобретение включает белок, содержащий последовательность аминокислоты SEQ ID NO: 9969, или последовательность аминокислоты имея идентификатор последовательности для SEQ ID NO: 9969. Изобретение дополнительно включает в себя полипептид, содержащий SEQ ID NO: 9969 и далее содержащий первый аминокислотная последовательность до N-конца SEQ ID NO: 9969. То изобретение дополнительно включает полипептид, содержащий последовательность SEQ ID Нет: 10079.

[0445] SEQ ID NO: 9968 кодирует аминокислотную последовательность QRT (рис. 113), затем последовал стоп-кодон. Соответственно, изобретение включает в себя белок содержит аминокислотную последовательность QRT. Изобретение дополнительно включает в себя полипептид, содержащий аминокислотную последовательность QRT и дополнительно содержащий а первая аминокислотная последовательность до N-конца последовательности QRT.

[0446] SEQ ID NO: 9968 кодирует аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10022, за ним следует стоп-кодон на его С-конце. Соответственно, изобретение включает протеин состоя из последовательности аминокислоты SEQ ID нет: 10022, или аминокислотная последовательность, имеющая идентичность последовательности SEQ ID NO: 10022. То изобретение дополнительно включает полипептид, содержащий SEQ ID NO: 10022 и более потом содержащ первую последовательность аминокислоты до n-terminus SEQ ID NO: 10022.

[0447] SEQ ID NO: 9968 кодирует аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10027. В рамках SEQ ID NO: 10027 последовательность кодирования существует по крайней мере три стартовые кодоны, отождествленные с подчеркиванием на фиг. 119. Открытое чтение кадр, указанный первым стартовым кодоном, является SEQ ID NO: 10081. Открытие рамка считывания, указанная вторым начальным кодоном, является SEQ ID NO: 10082. Открытая рамка считывания, указанная третьим начальным кодоном, является SEQ ID NO: 10083.

[0448] изобретение обеспечивает новую полинуклеотидную последовательность SARS SEQ ID Нет: 10084. Все шесть рамок считывания этой последовательности 1463 mer показаны в ИНЖИР. 120 (см. Также фиг. 122). Составные аминокислотные последовательности из ИНЖИР. 120, имеющие по крайней мере 4 аминокислоты, перечислены как SEQ ID NOS: 10085 до 10209 (см. 120A к 120F).

[0449] изобретение включает полинуклеотидную последовательность, содержащую SEQ ID Нет: 10084. Изобретение также предоставляет полинуклеотидные последовательности, имеющие идентификатор последовательности для SEQ ID NO: 10084. Изобретение также предусматривает: полинуклеотидные последовательности, содержащие фрагменты SEQ ID NO: 10084. Одновременно вариант осуществления, фрагмент полинуклеотида не состоит полностью из SEQ ID NO: 10033 или известная последовательность полинуклеотидов коронавируса или известная последовательность полинуклеотидов коронавируса ПОЛИНУКЛЕОТИДНАЯ последовательность SARS.

[0450] изобретение включает аминокислотную последовательность, кодируемую по формуле полинуклеотидная последовательность SEQ ID NO: 10084, включая аминокислоту последовательности фиг. 120A к 120F например выбранному от группы состоя из SEQ ID нет.отхлебывать.S: от 10085 до 10209. Предпочтительно, последовательность аминокислот содержит SEQ ID NO: 10149.

[0451] изобретение также обеспечивает аминокислотные последовательности, имеющие последовательность идентичность аминокислотной последовательности, кодируемой SEQ ID NO: 10084. То изобретение обеспечивает аминокислоты, имеющие идентичность последовательности к аминокислоте последовательность из фиг. 120A к 120F например выбранному от группы состоя из SEQ ID нет.отхлебывать.S: от 10085 до 10209.

[0452] изобретение также содержит фрагменты аминокислотных последовательностей кодируется SEQ ID NO: 10084. В изобретении также приводятся фрагменты аминокислотные последовательности, выбранные из группы, состоящей из SEQ ID нет.отхлебывать.S: от 10085 до 10209. В одном варианте осуществления фрагмента нет состоят полностью из аминокислотной последовательности, кодируемой SEQ ID NO: 10033 или аминокислотная последовательность известного коронавируса или аминокислотная последовательность об известном вирусе торс. Выравнивание совпадающей части SEQ ID нет: 10033 и SEQ ID NO: 10084 включены в FIG. 121.

[0453] в одном варианте осуществления изобретение содержит аминокислотную последовательность состоит из SEQ ID NO: 10149. Выравнивание последовательности полинуклеотидов Кодировка SEQ ID NO: 10084 для кодировки SEQ ID NO: 10149 показана на фиг. 122 (5'3' Кадр 3). Анализ 5'3' кадра 3 перевода с помощью компьютера программа для прогнозирования запуска кодонных метионинов (NetStart 1.0) (рис. 123) показывает SEQ ID нет.отхлебывать.S: от 10210 до 10215.

[0454] изобретение включает белок, содержащий аминокислотную последовательность выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10210, SEQ ID NO: 10211, SEQ ID NO: 10212, SEQ ID NO: 10213, SEQ ID NO: 10214 и SEQ ID NO: 10215. Изобретение включает в себя белок, имеющий идентичность последовательности к Ан аминокислотная последовательность, выбранная из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10210, SEQ ID NO: 10211, SEQ ID NO: 10212, SEQ ID NO: 10213, SEQ ID NO: 10214 и SEQ ID NO: 10215. В одном варианте осуществления белка нет состоят полностью из аминокислотной последовательности известного вируса атипичной пневмонии или а известный коронавирус.

[0455] изобретение включает фрагмент белка, содержащий аминокислотная последовательность, выбранная из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10210, SEQ ID NO: 10211, SEQ ID NO: 10212, SEQ ID NO: 10213, SEQ ID NO: 10214 и SEQ ID NO: 10215. В одном варианте исполнения фрагмент не состоит полностью аминокислотной последовательности известного вируса атипичной пневмонии или известного коронавируса.

[0456] в одном варианте осуществления изобретение включает полипептид, содержащий аминокислотная последовательность, выбранная из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10210, SEQ ID NO: 10211 и SEQ ID NO: 10212. Частичные результаты взрыва из SEQ ID NO: 10210 против GenBank включен в FIG. 124. Эти результаты показывают, что SEQ ID NOS: 10210, 10211 и 10212 имеют функциональный сходство с коронавирусной РНК-полимеразой, в частности с РНК полимеразы вируса гепатита мышей, коронавируса крупного рогатого скота и птицы инфекционный бронхит.

[0457] в одном варианте осуществления изобретение направлено на полипептид содержит первую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей SEQ ID NO: 10210, SEQ ID NO: 10211 и SEQ ID NO: 10212 и второй аминокислотная последовательность из С-конца последовательности коронавируса ORF1ab. Предпочтительно, чтобы вторая аминокислотная последовательность была получена из бычьего коронавируса. Один пример этого воплощения показан ниже как SEQ ID NO: 10216. Аmino кислоты 1-481 из seq ID нет: 10216 первая последовательность аминокислоты SEQ ИД нет: 10210, и аминокислоты 482-1152 вторая последовательность аминокислоты С-концевой части полипротеина orf1ab коронавируса крупного рогатого скота (Gi 26008080) (HP.SUB.--150073.2) (SEQ ID NO: 10217).

[0458] соответственно изобретение включает полипептид, содержащий SEQ ID NO: 10216. Изобретение дополнительно включает полипептид, содержащий а первая аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 10210 и вторая аминокислота последовательность SEQ ID NO: 10217. Изобретение дополнительно включает в себя полипептид, содержащий первую аминокислотную последовательность, имеющую размер больше x % идентичность к seq ID NO: 10210 и вторая последовательность аминокислоты имея больше, чем у % идентичность SEQ ID NO: 10217, где x больше, чем или равный 85% (например, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или больше) и где у больше или равно 60% (например, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% или даже больше).

[0459] изобретение также включает полипептид, содержащий фрагмент SEQ ID NO: 10210, где указанный фрагмент включает эпитоп. Компьютерно-предсказанные эпитопы SEQ ID NO: 10210, используя окно 17 мер, включены в FIG. 125A (Hopp & Woods) и рис. 125B (Kyte & Дюлиттл).

[0460] аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 10210 также содержит два прогнозируемые участки гликозилирования при аминокислотах 81-84 (NNTE; SEQ ID NO: 10218) и на 180-183 (NHSV; SEQ ID NO: 10219). Соответственно, изобретение включает полипептид, содержащий фрагмент SEQ ID NO: 10210, где указанный фрагмент включает участок гликозилирования. Изобретение дополнительно содержит полипептид, содержащий фрагмент SEQ ID NO: 10210, где указанный фрагмент включает в себя Asn в позиции 81. Желательно, сказал он АСН является гликозилированным веществом. Изобретение дополнительно включает полипептид содержащий фрагмент SEQ ID NO: 10210, где указанный фрагмент включает в себя АСН на позиции 180. Предпочтительно, чтобы указанный Asn был гликозилирован.

[0461] в одном варианте осуществления изобретение включает полипептид, содержащий аминокислотная последовательность внутри фиг. 120D и / или SEQ ID нет.отхлебывать.С: 10150 до 10160 например от SEQ ID нет.отхлебывать.S: 10154, 10155, 10158 и 10160. Внутри SEQ ID NO: 10154 следующие аминокислотные последовательности, начинающиеся с встречный и оканчивающийся на стоп-кодоне кодон может быть идентифицирован: SEQ ID NO.отхлебывать.С: От 10220 до 10227.

[0462] соответственно, изобретение включает полипептид, содержащий аминокислотная последовательность, выбранная из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10220, SEQ ID NO: 10221, SEQ ID NO: 10222, SEQ ID NO: 10223, SEQ ID NO: 10224, SEQ ID NO: 10225, SEQ ED NO: 10226 и SEQ ID NO: 10227, или а фрагмент его или аминокислотная последовательность, имеющая идентичность последовательности к этому.

[0463] в одном варианте осуществления изобретение включает полипептид, содержащий последовательность аминокислот внутри фиг. 120E например, от SEQ ID NO.отхлебывать.S: 10161 до 10182, и в частности SEQ ID NOS: 10171 и 10176. В пределах SEQ ID нет.отхлебывать.S: 10171 и 10176 следующие последовательности аминокислот начиная с меткой и окончанием на стоп-кодоне можно идентифицировать: SEQ ID NO: 10228 и SEQ ID NO: 10229.

[0464] соответственно, изобретение включает полипептид, содержащий аминокислотная последовательность, выбранная из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10228 и SEQ ID NO: 10229, или его фрагмент, или аминокислота последовательность, имеющая к ней идентичность последовательности.

[0465] в одном варианте осуществления изобретение включает полипептид, содержащий аминокислотная последовательность из фиг. 120F например SEQ ID нет.отхлебывать.S: 10183 to 10209. Внутри рис. 120F следующая аминокислотная последовательность, начинающаяся с а Встречный и оканчивающийся на стоп-кодоне кодон может быть идентифицирован: SEQ ID NO: 10187. Соответственно, изобретение включает полипептид, содержащий аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 10187, или ее фрагмент, или аминокислота последовательность, имеющая к ней идентичность последовательности.

[0466] в одном варианте осуществления полинуклеотиды изобретения не содержат включите один из следующих праймеров, раскрытых по адресу <http://content.nejm.org/cgi/reprint/NEJMoa030781v2.pdf>-да. ТАБЛИЦА-США-00040 5'GGTTGGGACTATCCTAAGTGTGA3' (SEQ ID NO: 10230) 5'ТААСАСАСААСИССАТСА3' (SEQ ID NO: 10231) 5'СТААСАТГСТТАГГАТААТГГ3' (SEQ ID NO: 10232) 5'GCCTCTCTGTCTTGCTCGC3' (SEQ ID NO: 10233) 5'СAGGТАAGCGТАААААТСАТС3' (SEQ ID NO: 10234)

[0467] изобретение также включает полинуклеотидные последовательности, которые могут быть используемые в качестве зондов для диагностических

реагентов, наборы (содержащие такие реагенты) и методы которые можно использовать для того чтобы диагностировать или определить присутствие или отсутствие вируса ОРВИ в биологическом образце. Изобретение включает в себя: полинуклеотидные праймеры, указанные в таблице 31 (SEQ ID NO.отхлебывать.S: 10235 до 10258), передние праймеры SEQ ID нет.отхлебывать.S: 10259 - 10281 и обратные праймеры SEQ ID нет.отхлебывать.S: 10282-10298. Изобретение далее включает в себя полинуклеотидные последовательности, которые комплементарны к любому из них эти последовательности праймеров раскрыты здесь.

[0468] изобретение обеспечивает ПОЛИНУКЛЕОТИДНУЮ последовательность SARS SEQ ID NO: 10299. Все шесть рамок считывания этой последовательности приведены на фиг. 126 (См. также рис. 131). Составные аминокислотные последовательности из фиг. 126, имея по крайней мере 4 аминокислоты, перечислены как SEQ ID NOS: от 10300 до 10337.

[0469] соответственно, изобретение включает полинуклеотидную последовательность состоит из SEQ ID NO: 10299. Он также обеспечивает последовательности полинуклеотида имея идентификатор последовательности для SEQ ID NO: 10299. Изобретение также обеспечивает: для полинуклеотидных последовательностей, содержащих фрагменты SEQ ID NO: 10299. В один вариант осуществления, фрагмент полинуклеотида не состоит полностью из известная полинуклеотидная последовательность вируса SARS или известный полинуклеотид последовательность коронавируса.

[0470] изобретение включает аминокислотную последовательность, кодируемую по формуле полинуклеотидная последовательность SEQ ID NO: 10299, включая аминокислоту последовательности, показанные на фиг. 126, и последовательности аминокислоты выбранные от группа, состоящая из SEQ ID NO.отхлебывать.S: от 10300 до 10337. Желательно, чтобы аминокислотная последовательность состоит из SEQ ID NO: 10316.

[0471] изобретение также обеспечивает аминокислотные последовательности, имеющие последовательность идентичность аминокислотной последовательности, кодируемой SEQ ID NO: 10299. То изобретение обеспечивает аминокислотные последовательности, имеющие идентичность аминокислоте последовательность, выбранная из группы, состоящей из SEQ ID NO.отхлебывать.S: от 10300 до 10337.

[0472] изобретение также содержит фрагменты аминокислотных последовательностей кодируется SEQ ID NO: 10299. В изобретении также приводятся фрагменты аминокислотные последовательности, выбранные из группы, состоящей из SEQ ID HET.отхлебывать.S: от 10300 до 10337. В одном варианте осуществления фрагмента нет состоят полностью из известной аминокислотной последовательности вируса ОРВИ или а известна аминокислотная последовательность коронавируса.

[0473] в одном варианте осуществления изобретение содержит аминокислотную последовательность состоит из SEQ ID NO: 10316. Закодированные открытые рамки считывания внутри SEQ ID Нет: 10316 включают SEQ ID NO: 10338 и SEQ ID NO: 10339.

[0474] в одном варианте осуществления изобретение содержит аминокислотную последовательность состоит из последовательности из 5 ' 3 ' кадра 1 перевод SEQ ID Нет: 10299. В этой области находится следующая закодированная открытая рамка считывания перевод: SEQ ID NO: 10340.

[0475] в одном варианте осуществления изобретение содержит аминокислотную последовательность состоит из последовательности из 3 ' 5 ' кадра 1 перевод SEQ ID Нет: 10299. Кодированная открытая рамка чтения в этом переводе-SEQ ID NO: 10341.

[0476] в одном варианте осуществления изобретение содержит аминокислотную последовательность состоит из последовательности из 3 ' 5 ' кадра 2 перевод SEQ ID Нет: 10299. Кодированная открытая рамка чтения в этом переводе-SEQ ID NO: 10342.

[0477] изобретение включает полипептид, содержащий аминокислоту последовательность, выбранная из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10338, SEQ ID NO: 10339, SEQ ID NO: 10340, SEQ ID NO: 10341 и SEQ ID NO: 10342. То изобретение включает полипептид, имеющий идентичность последовательности к аминокислотная последовательность выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10338, SEQ ID NO: 10339, SEQ ID NO: 10340, SEQ ID NO: 10341 и SEQ ID NO: 10342. Изобретение включает фрагмент полипептида, содержащий аминокислотная последовательность, выбранная из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10338, SEQ ID NO: 10339, SEQ ID NO: 10340, SEQ ID NO: 10341 и SEQ ID NO: 10342. В один вариант исполнения, фрагмент не состоит полностью из известного торс последовательность аминокислоты вируса или известной последовательности аминокислоты коронавируса.

[0478] в одном варианте осуществления SEQ ID NOS: 10338-10342 используются в синтезе белковая пища. Соответственно, стартовый кодон метионинов может быть удален. То изобретение содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы: состоящий из SEQ ID NO: 10343, SEQ ID NO: 10344, SEQ ID NO: 10345, SEQ ID NO: 10346 и SEQ ID NO: 10347.

[0479] в одном варианте осуществления изобретение содержит аминокислотную последовательность выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10338 и SEQ ID NO: 10339. Частичный взрыв результаты SEQ ID NO: 10338 против GenBank являются данный ниже: ТАБЛИЦА-US-00041 >GI|133593|sp|P18457 / RRPB_CVPFS РНК-направленная РНК-полимераза (ORF1B) gi / 93934 / pir| / a43489 РНК-направленная РНК-полимераза (EC 2.7.7.48) - свиной вирус трансмиссивного гастроэнтерита (фрагмент) GI|833161|emb|CAA37284.1 / полимераза [передающаяся гастроэнтерит вирус] Длина = 533 Оценка = 131 бит (329), ожидайте = 3e-30 Идентичности = 55/89 (61%), Положительные Стороны = 69/89 (77%), Пробелы = 1/89 (1%). Запрос: 1 MLWCKDGHVETFPKQLQASQAWQPGVAMPNLYKMQRMLEKCDLQNYGENAVIPKGMIMN 60 MLWC++ H++TFYP+LQ++ + W PG +MP LYK+QRM LE+C+L NYG +P G I N Sbjct: 217 MLWCENSHIKTFYPQLQSAE-WNPGYSMPPTYKIQRMCLERCNLYNYGAQVKLPDGGITTN 275 Запрос: 61 VAKYTQLCQYLNTLTLAVPSNMRVIFHFGA 89 V KYTQLCQYLNT TL VP MRV+H GA Sbjct: 276 VVKYTQLCQYLNTTLTLCVPHKMRVHLHGA 304

[0480] эти результаты показывают, что SEQ ID NO: 10338 имеет функциональный сходство с РНК-направленной РНК-полимеразой свиней, передающихся по наследству вирус гастроэнтерита.

[0481] частичный взрыв результаты SEQ ID NO: 10339 против GenBank являются данный ниже: ТАБЛИЦА-US-00042 >gb|AAL57305.1 / replicase [коронавирус крупного рогатого скота] Длина = 7094 Оценка = 139 бит (351), ожидайте = 7e-33 Идентичности = 64/108 (59%), Положительные Стороны = 78/108 (72%) Запрос: 1 MSVISKVVKVTIDYAEISFMLWCKDGHVETFPKQLQASQAWQPGVAMPNLYKMQRMLEK 60 M+ + SKVV V +D+ + FMLWC D V TFYP+LQA+ W+PG +MP LYK +E+ Sbjct: 6760 LNCVSKVNVNVDFKDFQFMLWCNDEKVMTFYPRLQAASDWKPGYSMPVLYKYLNNSPME 6819 Запрос: 61 CDLQNYGENAVIPKGMIMNVAKYTQLCQYLNTLTLAVPSNMRVIFHFGA 108 L NYG+ + P G MMNVAKYTQLCQYLNT TLAVP NMRV+H GA Sbjct: 6820 VSLWNYGKPVTLPTGCMNVAKYTQLCQYLNTTLAVPNMRVHLHGA 6867

[0482] эти результаты показывают, что SEQ ID NO: 10339 имеет функциональный сходство с репликазой бычьего коронавируса.

[0483] вирус атипичной пневмонии может содержать полиморфизм в остатке Glu-20 SEQ ID NO: 10338. Изобретение включает полипептид, содержащий аминокислотная последовательность, имеющая идентичность последовательности SEQ ID NO: 10338, где указанный полипептид включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы состоит из ASQAW (SEQ ID NO: 10348) и ASRAW (SEQ ID NO: 10349). То изобретение включает фрагмент полипептида, содержащего SEQ ID NO: 10338, где указанный фрагмент включает выбранную аминокислотную последовательность из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10348 и SEQ ID NO: 10349.

[0484] вирус атипичной пневмонии может содержать полиморфизм в остатке Ser-80 SEQ ID NO: 10338. ниже. Изобретение включает полипептид, содержащий аминокислотная последовательность, имеющая идентичность последовательности SEQ ID NO: 10338, где указанный полипептид включает аминокислотную последовательность, выбранную из группа, состоящая из VPSNM (SEQ ID NO: 10350) и VPTNM (SEQ ID NO: 10351). Изобретение включает фрагмент полипептида, содержащего SEQ ID NO: 10338, где указанный фрагмент включает аминокислотную последовательность выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10350 и SEQ ID NO: 10351.

[0485] изобретение также включает полинуклеотидные последовательности, которые могут быть используемые в качестве зондов для диагностических реагентов, наборы (содержащие такие реагенты) и методы которые можно использовать для того чтобы диагностировать или определить присутствие или

набор, содержащий полинуклеотидную последовательность, кодирующую а полипептид, содержащий по меньшей мере одну из выбранных аминокислотных последовательностей из группы, состоящей из SEQ ID NO.отхлебывать.S: 11561 и 11562. То изобретение включает иммуногенную композицию, содержащую полипептид содержащий по меньшей мере одну из аминокислотных последовательностей, выбранных из группа, состоящая из SEQ ID NO.отхлебывать.S: 11561 и 11562. Изобретение включает антитело, которое распознает полипептид, содержащий по меньшей мере одна из аминокислотных последовательностей, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID HET.отхлебывать.S: 11561 и 11562.

[0509] изобретение включает полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 11563 или его фрагмент, или последовательность, имеющая идентичность последовательности к нему. Полипептидные последовательности, которые могут быть переведены из SEQ ID NO: 11563 являются показано на фиг. 128. Составные аминокислотные последовательности из фиг. 128, имея по крайней мере 4 аминокислоты, перечислены как SEQ ID NO.отхлебывать.S: 11564 to 11617.

[0510] изобретение включает в себя полипептидную последовательность, выбранную из группа, состоящая из последовательностей фиг. 128, или фрагмент его или а последовательность, имеющая идентификатор последовательности, например SEQ ID NO.отхлебывать.S: 11563 to 11617.

[0511] последовательность полипептида в пределах SEQ ID NO: 11600 is SEQ ID NO: 11618. Изобретение включает полипептид, содержащий SEQ ID NO: 11618, или его фрагмент, или последовательность, имеющая идентичность последовательности к нему.

[0512] последовательность полипептида в пределах SEQ ID NO: 11602 is SEQ ID NO: 11641. Изобретение включает полипептид, содержащий SEQ ID NO: 11641, или его фрагмент, или последовательность, имеющая идентичность последовательности к нему.

[0513] последовательность полипептида в пределах SEQ ID NO: 11609 is SEQ ID NO: 11619.

[0514] изобретение включает полинуклеотид, кодирующий (i) аминокислоту последовательность выбрана из группы, состоящей из: (1) аминокислоты последовательности на фиг. 128, и в частности SEQ ID NO.отхлебывать.S: 11564-11617; (2) SEQ ID NO: 11618; и (3) SEQ ID NO: 11619, или (ii) фрагмент из этого. Изобретение включает диагностический набор, содержащий один или более из этих белков. Изобретение включает диагностический набор, содержащий: полинуклеотидная последовательность, кодирующая один или более из этих полипептидов последовательности. Изобретение включает антитело, которое распознает одно или больше полипептидных последовательностей.

[0515] вирус SARS может содержать полиморфизм в остатке изолейцина Ile-326 в SEQ ID NO: 11620 (Chi-PEP3). Изобретение включает в себя: полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую идентичность последовательности к SEQ ID NO: 11620, где указанный полипептид включает аминокислоту последовательность, выбранная из группы, состоящей из YAIHH (SEQ ID NO: 11621) и YATHH (SEQ ID NO: 11622). Изобретение включает в себя фрагмент а полипептид, содержащий SEQ ID NO: 11620, где указанный фрагмент включает аминокислотная последовательность, выбранная из группы, состоящей из YAIHH (SEQ ID NO: 11621) и YATHH (SEQ ID NO: 11622).

[0516] вирус атипичной пневмонии может содержать полиморфизм в остатке глутамина Gln-830 в SEQ ID NO: 11620. Изобретение включает полипептид содержащая аминокислотную последовательность, имеющую идентичность последовательности SEQ ID NO: 11620, где указанный полипептид включает выбранную аминокислотную последовательность из группы, состоящей из ASQAW (SEQ ID NO: 11623) и ASRAW (SEQ ID NO: 11624). Изобретение включает фрагмент полипептида, содержащий SEQ ID NO: 11620, где указанный фрагмент включает аминокислотную последовательность выбранный из группы, состоящей из ASQAW (SEQ ID NO: 11623) и ASRAW (SEQ ID NO: 11624).

[0517] вирус SARS может содержать полиморфизм с остатком аспарагиновой кислоты Asp-935 в SEQ ID NO: 11620. Изобретение включает полипептид содержащая аминокислотную последовательность, имеющую идентичность последовательности SEQ ID NO: 11620, где указанный полипептид включает выбранную аминокислотную последовательность из группы, состоящей из DADST (SEQ ID NO: 11625) и DAYST (SEQ ID NO: 11626). Изобретение включает фрагмент полипептида, содержащий SEQ ID NO: 11620, где указанный фрагмент включает аминокислотную последовательность выбранный из группы, состоящей из DADST (SEQ ID NO: 11625) и DAYST (SEQ ID NO: 11626).

[0518] вирус SARS может содержать полиморфизм в остатке Серина Ser-577 в SEQ ID нет: 11627 (Chi-PEP4). Изобретение включает полипептид содержащая аминокислотную последовательность, имеющую идентичность последовательности SEQ ID NO: 11627, где указанный полипептид включает выбранную аминокислотную последовательность из группы, состоящей из PCSFG (SEQ ID NO: 11628) и PCAFG (SEQ ID NO: 11629). Изобретение включает фрагмент полипептида, содержащий SEQ ID NO: 11627, где указанный фрагмент включает аминокислотную последовательность выбранный из группы, состоящей из PCSFG (SEQ ID NO: 11628) и PCAFG (SEQ ID NO: 11629).

[0519] вирус SARS может содержать полиморфизм в остатке валина Val-68 в SEQ ID нет: 11630 (Chi-PEP8). Изобретение включает полипептид содержащая аминокислотную последовательность, имеющую идентичность последовательности SEQ ID NO: 11630, где указанный полипептид включает выбранную аминокислотную последовательность из группы, состоящей из LAVVY (SEQ ID NO: 11631) и LAAVY (SEQ ID NO: 11632). Изобретение включает фрагмент полипептида, содержащий SEQ ID NO: 11630, где указанный фрагмент включает аминокислотную последовательность выбранный из группы, состоящей из LAVVY (SEQ ID NO: 11631) и LAAVY (SEQ ID NO: 11632).

[0520] вирус SARS может содержать полиморфизм в остатке изолейцина Ile-50 in SEQ ID NO: 11633 (Chi-PEP13). Изобретение включает в себя: полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую идентичность последовательности к SEQ ID NO: 11633, где указанный полипептид включает аминокислоту последовательность, выбранная из группы, состоящей из NNIAS (SEQ ID NO: 11634) и NNTAS (SEQ ID NO: 11635). Изобретение включает в себя фрагмент а полипептид, содержащий SEQ ID NO: 11633, где указанный фрагмент включает аминокислотная последовательность, выбранная из группы, состоящей из NNIAS (SEQ ID NO: 11634) и NNTAS (SEQ ID NO: 11635).

[0521] вирус SARS может содержать полиморфизм в остатке Серина Ser-943 in SEQ ID NO: 11636. Изобретение включает полипептид содержащая аминокислотную последовательность, имеющую идентичность последовательности SEQ ID NO: 11636, где указанный полипептид включает выбранную аминокислотную последовательность из группы, состоящей из AVSAC (SEQ ID NO: 11637) и AVGAC (SEQ ID NO: 11638). Изобретение включает фрагмент полипептида, содержащий SEQ ID NO: 11636, где указанный фрагмент включает в себя аминокислоту sequence выбранный из группы, состоящей из AVSAC (SEQ ID NO: 11637) и AVGAC (SEQ ID NO: 11638).

[0522] изобретение включает полинуклеотид SEQ ID NO: 11639, или а фрагмент его или последовательность, имеющая к нему идентичность последовательности. То изобретение включает полипептид, кодируемый полинуклеотидной последовательностью изложено в SEQ ID NO: 11639, или его фрагменте, или полипептиде последовательность, имеющая к ней идентичность последовательности.

[0523] изобретение включает полинуклеотид, указанный в SEQ ID NO: 11640, или его фрагмент, или последовательность, имеющая идентификацию последовательности к этому. Изобретение включает полипептид, кодируемый посредством полинуклеотидная последовательность, установленная в SEQ ID NO: 11640, или фрагмент его или полипептидную последовательность, имеющую тождественную ей последовательность.

[0524] изобретение включает каждый из идентифицированных полинуклеотидов выше. Изобретение включает каждый из полинуклеотидов, изложенных в перечень последовательностей. Изобретение дополнительно включает полинуклеотиды имею идентичность последовательности к каждому из полинуклеотидов определенных выше. Степень идентичности последовательности предпочтительно превышает 50% (например, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или даже больше).

[0525] изобретение включает полинуклеотидные последовательности, содержащие фрагменты каждой из полинуклеотидных последовательностей идентифицированы выше. То фрагменты должны содержать по меньшей мере n последовательных полинуклеотидов из а конкретный SEQ ID NO.; and, B зависимости от последовательности, n равно 7 или более (например, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31,

32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 80, 90, 100, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300 или даже больше).

[0526] изобретение включает в себя каждую из аминокислотных последовательностей, кодируемых посредством каждая из полинуклеотидных последовательностей идентифицирована выше. Изобретение включает в себя каждый из аминокислотных последовательностей, кодируемых каждым из полинуклеотидных последовательности, указанные в перечне последовательностей. Изобретение более потом включает последовательности аминокислоты имея идентичность последовательности к аминокислотные последовательности, кодируемые каждой из полинуклеотидных последовательностей указанный выше. Степень идентичности последовательности предпочтительно больше чем 50% (например, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более). Изобретение дополнительно включает фрагменты аминокислоты последовательности, кодируемые каждой из идентифицированных полинуклеотидных последовательностей выше. Фрагменты должны содержать по меньшей мере n последовательных аминокислот из определенного SEQ ID NO.; and, В зависимости от последовательности, n равно 7 или еще (например, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 80, 90, 100, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300 или даже больше).

[0527] изобретение включает каждую из идентифицированных аминокислотных последовательностей выше. Изобретение включает каждую из установленных аминокислотных последовательностей в списке последовательностей. Изобретение дополнительно включает аминокислоту последовательности, имеющие идентичность последовательности каждой из аминокислотных последовательностей указанный выше. Степень идентичности последовательности предпочтительно больше чем 50% (например, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более).

[0528] изобретение дополнительно включает фрагменты аминокислоты последовательности, указанные выше. Фрагменты должны содержать не менее n последовательных аминокислоты из определенного SEQ ID NO.; and, В зависимости от последовательности, n - это 7 или более (например, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 80, 90, 100, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300 и более).

[0529] изобретение включает полинуклеотиды, кодирующие каждый из аминокислот кислотные последовательности, указанные выше. Изобретение включает в себя полинуклеотиды кодирование каждой из аминокислотных последовательностей, указанных в последовательности перечисление. Изобретение дополнительно включает полинуклеотиды, имеющие последовательность идентичность с каждым из полинуклеотидов, кодирующих каждую из аминокислот последовательности, указанные выше. Степень идентичности последовательности предпочтительна более 50% (например, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% и более).

[0530] изобретение дополнительно включает фрагменты полинуклеотидов кодирование каждой из аминокислотных последовательностей, указанных выше. Фрагмент должны содержать по меньшей мере n последовательных полинуклеотидов из конкретного SEQ ID NO.; and, В зависимости от последовательности, n равно 7 или более (например, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 80, 90, 100, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300 или даже больше).

[0531] как описано более подробно ниже, полинуклеотиды для использования в качестве праймеры и / или как зонды могут содержать по крайней мере 4 или 8 смежных нуклеотиды из полинуклеотидной последовательности изобретения, например, по меньшей мере 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, или 30 смежных нуклеотиды и до около 50, 75, 100, 200 смежных нуклеотиды или даже больше. В то время как 6-8 нуклеотидов могут быть работоспособной длины, предпочтительны последовательности из 10-12 нуклеотидов, а также около 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, или 21 или больше нуклеотидов или больше кажется оптимальным для гибридизация.

[0532] в одном варианте осуществления изобретение направлено на полинуклеотиды и аминокислотных последовательностей, которые не состоят полностью из известного SARS вирусный полинуклеотид или аминокислотная последовательность известного коронавируса полинуклеотидная или аминокислотная последовательность. В одном варианте осуществления, the полинуклеотиды и аминокислотные последовательности изобретения не состоят полностью из последовательности SEQ ID NO: 1. В другом варианте осуществления, the полинуклеотиды и аминокислотные последовательности изобретения не состоят полностью из последовательности SEQ ID NO: 2. SEQ ID NO: 9967-это геном атипичной пневмонии последовательность Франкфуртского изолята (FRA) (GenBank: AY310120). По сравнению с SEQ ID NO: 1, он отличается на нуклеотидах 2546, 2590, 11437, 18954, 19073, 20585, 20899, 23209, 24922, 26589 & 28257; по сравнению с SEQ ID NO:2, it отличается по нуклеотидам 2560, 7922, 11451, 16625, 18968 & 19067. В дальнейшем последовательности генома стали доступны в GenBank, так как это заявка была первоначально подана под номерами для присоединения, включая AY559097, AY559096, AY559095, AY559094, AY559093, AY559092, AY559091, AY559090, AY559089, AY559088, AY559087, AY559086, AY559085, AY559084, AY559083, AY559082, AY559081, AY274119, AY323977, AY291315, AY502932, AY502931, AY502930, AY502929, AY502928, AY502927, AY502926, AY502925, AY502924, AY502923, AY291451, AY390556, AY395003, AY395002, AY395001, AY395000, AY394999, AY394998, AY394997, AY394996, AY394995, AY394994, AY394993, AY394992, AY394991, AY394990, AY394989, AY394988, AY394987, AY394986, AY394985, AY394983, AY394979, AY394978, AY508724, AY394850, AY463059, AY463060, AY313906, AY310120, AY461660, AY485278, AY485277, AY345988, AY345987, AY345986, AY282752, AY357076, AY357075, AY350750, AY304495, AY304488, AY304486, AY427439, AY283798, AY278491, AY278489, AY362699, AY362698, AY283797, AY283796, AY283795, AY283794, AY278741, AY351680, AP006561, AP006560, AP006559, AP006558, AP006557, AY278554, AY348314, AY338175, AY338174, AY321118, AY279354, AY278490, AY278487, AY297028, AY278488, и ND.SUB.-004718.

[0533] в другом варианте осуществления изобретение направлено на полинуклеотиды, кодирующие белки, которые иммунологически не пересекаются реактивный с белком вируса гепатита мыши, коронавируса крупного рогатого скота или вирус птичьего инфекционного бронхита. В другом варианте осуществления, the изобретение направлено на белки, которые не являются иммунологически перекрестными реактивный с белком вируса гепатита мыши, коронавируса крупного рогатого скота или вирус птичьего инфекционного бронхита.

[0534] каждый из идентифицированных выше полинуклеотидов может быть использован для кодирования часть белка слияния. Соответственно, изобретение компримирует одно или больше из полинуклеотидов, идентифицированных выше, где полинуклеотиды кодировка для стартового кодона удаляется. Изобретение дополнительно содержит одна или несколько из аминокислот, идентифицированных выше, где начало метионин удаляется.

[0535] любая из полинуклеотидных или аминокислотных последовательностей, рассмотренных выше может быть использован в вакцинах для лечения или профилактики вируса ОРВИ инфекция, в том числе в виде вирусного антигена ОРВИ. Кроме того, любой из полинуклеотиды или аминокислотные последовательности, рассмотренные выше, могут использоваться в качестве диагностические реагенты, или в наборах (содержащих такие реагенты), или в способах использованный для того чтобы диагностировать или определить присутствие или отсутствие вируса SARS в а биологический образец.

[0536] вирусные антигены SARS изобретения могут включать полипептид с помощью 99%, 95%, 90%, 85%, или 80% гомологии к одному или нескольким из группы состоит из следующих белков: неструктурный белок 2 (NS2); гемагглютинин-эстеразный гликопротеин (HE) (также называемый E3), spike гликопротеин (B) (также называемый E2), неструктурная область 4 (NS4), белок оболочки (малая мембрана) (E) (также называемый sM), мембрана гликопротеин (M) (также называемый E1), фосфопротеин нуклеокапсида (N) или РНК-зависимая РНК-полимераза (pol).

[0537] детальное обсуждение биологии Короавируса можно найти в полях Вирусология (2-е изд.), Филдс и др. (ЭЦП.), В. N. Raven Press, Нью-Йорк, Нью-Йорк, глава 35.

[0538] другой пример изолята вируса SARS приведен в Примере 1 ниже. Изобретение включает в себя каждый из полипептидов и полинуклеотидов последовательности, определенные в Примере 1. Кроме того, изобретение включает в себя вакцинные композиции, содержащие один или более полипептида или полинуклеотидные последовательности идентифицированы в Примере 1. Изобретение включает в себя: диагностические регенты,

наборы (содержащие такие реагенты) и способы, которые может использоваться для диагностики или определения наличия или отсутствия тора вирус в биологическом образце используя один или больше из полипептида или полинуклеотидные последовательности идентифицированы в Примере 1. Изобретение включает в себя: способы лечения или профилактики вирусной инфекции тора с использованием малые молекулы вирусные ингибиторы и комбинации малых молекул вирусных ингибиторов ингибиторы и наборы для лечения ОРВИ. Маленькая молекула ингибиторы могут специфически нацеливаться на один или несколько из полипептидов или полинуклеотиды идентифицированы в Примере 1.

[0539] Ниже приводится дальнейшее обсуждение терминов, используемых в приложении.

[0540] "респираторный вирус", используемый здесь, относится к вирусу, способному заражение дыхательных путей человека. Респираторные Вирусные Антигены пригодны для использования в изобретении включают тяжелые острые респираторные заболевания Вирус синдрома, коронавирус, вирус гриппа, риновирус человека (BCP), вирус парагриппа (ПВВ), респираторно-синцитиальный вирус (PCB), аденовирус, метапневмовирус и риновирус.

[0541] термины "полипептид", "белок" и "аминокислотная последовательность" как используемые здесь обычно относятся к полимер аминокислотных остатков и являются не ограничиваются минимальной длиной изделия. Таким образом, пептиды, олигопептиды, димеры, мулимеры и тому подобное входят в состав определение. Как полноразмерные белки, так и их фрагменты являются охватывается этим определением. Минимальные фрагменты полезных полипептидов в изобретении может быть не меньше 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, или даже 15 аминокислот. Как правило, полипептиды полезны в этом изобретении сможете иметь максимальную длину соответствующую для предназначенного применения. Как правило, максимальная длина не критична и может быть легко выбрана одним искусным в этом деле человеком.

[0542] полипептиды изобретения могут быть получены многими способами, например путем химический синтез (по крайней мере, частично), путем переваривания более длинных полипептидов использование протеаз, путем трансляции от РНК, путем очищения от клетки культура (например от рекомбинантного выражения), от самого организма (например после вирусной культуры, или сразу от пациентов), от линии клетки источник etc. Предпочтительный способ получения пептидов кислоты долго участвуют в химическом синтезе *in vitro* (Bodanszky (1993) Принципы синтеза пептидов (ISBN: 0387564314); Fields et al. (1997) Методы в энзимологии 289: Твердофазный синтез пептидов. номер ISBN: 0121821900). Особенно предпочтительен твердофазный синтез пептидов, такие как методы, основанные на t-Бос или Fmoc (Chan & White (2000) Fmoc Solid Фаза синтеза пептидов ISBN: 0199637245) химия. Ферментативный синтез (Kullmann (1987) Ферментативный Синтез Пептида. ISBN: 0849368413) также может используйте частично или полностью. Как альтернатива химическому синтезу, биологический синтез может быть использован например полипептиды могут быть произведены мимо перевод. Это может быть выполнено *in vitro* или *in vivo*. Биологический способы, как правило, ограничены производством полипептидов на основе на L-аминокислотах, но манипуляции с переводческой техникой (например, о молекулы аминокислот tPHK) можно использовать для того чтобы позволить введению D-аминокислоты (или других ненатуральных аминокислот, таких как йодтирозин или метилфенилаланин, азидогомоаланин, etc.) (Ibba (1996) Biotechnol Genet Eng Rev 13: 197-216.). Где D-аминокислоты включены, однако, оно предпочтительно использовать химический синтез. Полипептиды изобретения могут имеют ковалентные модификации на C-конце и / или N-конце, в частности где они для внутри-администрации *vivo* например приложением ацетила или карбоксиамида, как в Fuzeon.TM-продукт.

[0543] ссылка на полипептиды и тому подобное также включает производные из аминокислотных последовательностей изобретения. Такие производные могут включать постэкспрессионные модификации полипептида, например, гликозилирование, ацетилирование, фосфорилирование и тому подобное. Аминокислота производные также могут включать модификации нативной последовательности, такие как как исключения, дополнения и замены (как правило, консервативные в природа), до тех пор, пока белок сохраняет желаемую активность. Эти модификации могут быть преднамеренными, как через сайт-направленный мутагенез, или может быть случайным, например, через мутации.хозяева, которые производят белки или ошибки, вызванные ПЦР-амплификацией. Кроме того, изменения могут быть сделаны которые имеют одно или больше из следующих влияний: уменьшающ токсичность; облегчат обработку клетки (например, секретирование, антиген презентация и т.д.); и облегчение представления информации в-клеткам и/или Т-клетки.

[0544] "фрагмент" или "порция", используемые здесь, относятся к полипептиду состоит только из части интактной полнометражной полипептидной последовательности и структура как найдено в природе. Например, фрагмент может включать в себя C-терминальное удаление и / или N-терминальное удаление белка.

[0545] "рекомбинантный" белок-это белок, который был получен путем рекомбинантные методы ДНК как описано здесь. В общем и целом, ген интерес клонируется и затем выражается в трансформированных организмах, как описано далее ниже. Организм хозяина выразил чужеродный ген к произведите протеин под условиями выражения.

[0546] термин "полинуклеотид", как известно в данной области техники, обычно относится к молекуле нуклеиновой кислоты. А "полинуклеотид" может включать в себя оба двойника-а одноцепочечные последовательности и вовсе относятся к кднк, но не ограничиваются ею из вирусных, прокариотических или эукариотических мРНК, геномных последовательностей РНК и ДНК от вирусных (например, РНК-и ДНК-вирусы и ретровирусы) или прокариотических ДНК, и особенно синтетические последовательности ДНК. Этот термин также захватывает последовательности, включающие любой из известных базовых аналогов ДНК и РНК, и включает в себя изменения, такие как удаление, добавления и замены (вообще консервативный в природе), к родной последовательности, покада молекула нуклеиновой кислоты кодирует терапевтический или антигенный белок. Эти изменения могут быть преднамеренными, как через сайт-направленный мутагенез, или может быть случайным, например, через мутации хозяев которые производят антигены. Модификации полинуклеотидов могут иметь любые количество эффектов, включая, например, облегчение выражения полипептидный продукт в клетке-хозяине.

[0547] полинуклеотиды изобретения могут быть получены многими способами, например: путем химического синтеза (например, фосфорамидитного синтеза ДНК) в целом или в частности, путем переваривания более длинных нуклеиновых кислот с использованием нуклеаз (например ферменты рестрикции), путем присоединения более коротких нуклеиновых кислот или нуклеотидов (например, с использованием лигаз или полимераз), из геномных библиотек или библиотек кднк и т. д.

[0548] полинуклеотид может кодировать биологически активное вещество (например, иммуногенный или терапевтический) белок или полипептид. В зависимости от того: природа полипептида, кодируемого полинуклеотидом, а polynucleotide может включать в себя всего лишь 10 нуклеотидов, например, где полинуклеотид кодирует антиген.

[0549] под "изолированным" подразумевается, когда речь идет о полинуклеотиде или а полипептид, что указанная молекула является отдельной и дискретной от весь организм, с которым молекула находится в природе или, когда полинуклеотид или полипептид не найден в природе, достаточно освободите других биологических макромолекул так, что полинуклеотид или полипептид может быть использован по прямому назначению. Полинуклеотиды и полипептиды изобретения предпочтительно представляют собой изолированные полинуклеотиды и выделенные полипептиды.

[0550] "антитело", известное в данной области техники, включает одно или несколько биологических Фратрии, которые с помощью химических или физических средств могут связываться с или ассоциируют с эпитопом интересующего полипептида. Антитела к ним: изобретение включает антитела, которые специфически связываются с вирусом ОРВИ антиген. Термин "антитело" включает антитела, полученные из обоих видов поликлональные и моноклональные препараты, а также следующие: гибридные (химерные) молекулы антител (см., например, Winter et al. (1991) Природа 349: 293-299; и США Пат. № 4.816.567; F (ab)₂.SUB.2 и F (ab) фрагменты; F. sub.V молекулы (нековалентные гетеродимеры, см., Для например, Inbar et al. (1972) Proc Natl Acad Sci USA 69: 2659-2662; и Ehrlich et al. (1980) Biochem 19:4091-4096); одноцепочечные молекулы Fv (sfv) (см., например, Huston et al. (1988) Proc Natl Acad Sci USA 85: 5897-5883); димерные и тримерные конструкции фрагмента антитела; минибоды (см., например, Pack et al. (1992) Biochem 31: 1579-1584; Cumber et Аль. (1992) J Иммунология 149В: 120-126); гуманизированные молекулы антител (см., например, Riechmann et al. (1988) Nature 332: 323-327; Верхоян и др. (1988) Science 239: 1534-1536; и У. К. патентная публикация№. Гб 2,276,169, опубликовано 21 сен. 1994); и любые функциональные фрагменты полученные из таких молекул, где такие фрагменты сохраняют иммунологические свойства связывающие свойства молекулы родительского антитела. Термин "антитело" дополнително включает антитела, полученные с помощью нетрадиционных процессов, как дисплей фага.

[0551] как использовано здесь, термин "моноклональное антитело" ссылается к антителная композиция, имеющая однородную популяцию антител. Срок

не ограничено относительно вида или источника антитела, ни оно предназначенный быть ограниченным способом, которым это сделано. Таким образом, термин включает антитела, полученные из гибридом мышей, а также человека моноклональные антитела, полученные с использованием гибридом человека, а не мышей. См., например, Cote и др. Моноклональные антитела и терапия рака, Алан P. Liss, 1985, p 77.

[0552] "иммуногенная композиция", используемая здесь, относится к а композиция, содержащая антигенную молекулу, в которой введение состав к предмету приводит в развитии в предмете гуморальный и / или клеточный иммунный ответ на антигенную молекулу антигенного вещества интерес. Иммуногенная композиция может быть введена непосредственно в а субъект-реципиент, например, путем инъекции, ингаляции, перорального, интраназального введения или любые другие парентеральные, слизистые или трансдермальные (например, интаректально или интра-вагинально) маршрут введения.

[0553] термин "производный от" используется для идентификации источника молекулы (например, молекула может быть получена из полинуклеотида, полипептида, Ан бессмертную клеточную линию можно вывести из любой ткани и т.д.). Начало полинуклеотид является "производным" от второго полинуклеотида, если он имеет такая же или существенно такая же последовательность basepair как регион второй полинуклеотид, его кднк, их дополнения, или если он отображает идентичность последовательности, как описано выше. Таким образом, образуется первый полинуклеотид последовательность является "производной" от второй последовательности, если она имеет (i) то же самое или по существу та же последовательность, что и вторая последовательность или (ii) дисплеи идентичность последовательности полипептидам этой последовательности.

[0554] первый полипептид является "производным" от второго полипептида, если он is (i) кодируется первым полинуклеотидом, полученным из второго полинуклеотид, или (ii) отображает идентичность последовательности для второго полипептиды как описано выше. Таким образом, полипептид (белок) является "производный от" конкретного вируса атипичной пневмонии, если он (i) закодирован открытым рамка считывания полинуклеотида этого вируса SARS, или (ii) дисплеи идентичность последовательности, как описано выше, к полипептидам этого SARS вирус.

[0555] как полинуклеотидные, так и полипептидные молекулы могут быть физически полученные из вируса торс или полученные рекомбинантно или синтетически, для пример, основанный на известных последовательностях.

[0556] культивируемая клетка или клеточная линия является "производным" от другой клетки, клеток или ткани, если она первоначально получена из существующих клеток или тканей. Не-ограничиваясь примеры ткани которую клетки могут быть выведены от включают кожа, сетчатка, печень, почки, сердце, мозг, мышцы, кишечник, завязь, молочная железа, простата, раковые ткани, ткани, инфицированные одним или несколькими возбудителями патогены (например, вирусы, бактерии и т.д.) и тому подобное. Ячейка описанные здесь также могут быть получены из других клеток в том числе, но не ограничиваются, первичными культурами, существующими бессмертными клетками линии и/или другие изолированные клетки.

[0557] "антиген" относится к молекуле, содержащей один или несколько эпитопов (или линейный, конформационный или оба) который стимулирует хозяина иммунная система, чтобы сделать гуморальный и / или клеточный антиген специфичным ответ. Этот термин используется взаимозаменяемо с термином " иммуноген." Обычно, эпитоп будет включать в себя около 3-15, как правило, около 5-15 аминокислот. Эпитоп в-клетки нормально около 5 аминокислот но может быть всего 3-4 аминокислоты. Т-клеточный эпитоп, например CTL эпитоп, будет включать в себя по крайней мере около 7-9 аминокислот, а также вспомогательную Т-клетку эпитоп по крайней мере около 12-20 аминокислот. Как правило, эпитоп будет включите между около 7 и 15 аминокислотами, как, 9, 10, 12 или 15 амина кислоты. Термин "антиген" обозначает оба субъединицы антигенов, (т. е., антигены, которые являются отдельными и дискретными от целого организма, с которым антиген ассоциирован в природе), а также, убитый, ослабленный или инактивированные бактерии, вирусы, грибы, паразиты или другие микробы, а также в качестве опухолевых антигенов, включая внеклеточные Домены клеточной поверхности рецепторы и внутриклеточные участки, которые могут содержать Т-клеточные эпитопы. Антитела, такие как антиидиотипические антитела, или их фрагменты, и синтетические пептидные мимотопы, которые могут имитировать антиген или антигенное вещество детерминант, также захвачен под определением антигена как использовано здесь. Аналогично, олигонуклеотид или полинуклеотид, который выражает антиген или антигенная детерминанта in vivo, такие как в генной терапии и ДНК иммунизация приложений, также входит в определение антигена здесь.

[0558] "иммунологическим ответом" на антиген или композицию является развитие у субъекта гуморального и / или клеточного иммунного ответа к антигену, присутствующему в составе интересующего вещества. Для целей настоящего Закона: настоящее изобретение, "гуморальный иммунный ответ" относится к иммунной системе реакция, опосредованная молекулами антител, включая секреторные (IgA) или IgG молекулы, в то время как " клеточный иммунный ответ " является одним из опосредованных Т-лимфоциты и / или другие лейкоциты. Один из важных аспектов: клеточный иммунитет включает в себя антиген-специфический ответ цитолитическим путем Т-клетки ("CTL" s). CTLs имеют специфичность для пептидных антигенов, которые являются представлен в ассоциации с белками, кодируемыми мажором комплекс гистосовместимости (МНС) экспрессируется и на поверхности клеток. CTLs помогают индуцировать и способствовать разрушению внутриклеточных микробов, или лизис клеток, зараженных такими микробами. Еще один аспект клеточный иммунитет включает в себя антиген-специфический ответ хелпером Т-клетки. Т-клетки хелпера действуют, что помогают стимулировать функцию, и фокусируют активность неспецифических эффекторных клеток в отношении клеток, содержащих пептид антигены в ассоциации с молекулами МНС на их поверхности. Сотовая связь иммунный ответ " также относится к продукции цитокинов, хемокинов и другие подобные молекулы, продуцируемые активированными Т-клетками и / или другими белыми веществами клетки крови, в том числе полученные из CD4+ и CD8+ Т-клеток. В добавление, реакция хемокина может быть наведена различной белой кровью или эндотелиальные клетки в ответ на введенный антиген.

II. составы вакцин

[0559] изобретение относится к вакцинным препаратам для лечения или профилактика тяжелого острого респираторного синдрома (ОРВИ). Вакцина рецептуры изобретения включают инактивированный (или убитый) торс вирус, ослабленный вирус ОРВИ, разделенная подготовка вируса ОРВИ и а рекомбинантный или очищенный субъединичный состав одного или более вируса ОРВИ антигены. Изобретение включает полипептиды и полинуклеотиды кодирование вирусных антигенов ОРВИ и их иммуногенных фрагментов. Экспрессия и доставка полинуклеотидов по изобретению могут быть: облегчается с помощью вирусных векторов и / или вирусных частиц, включая вирус Например, Частицы (VLPs).

A. инактивированные (или убитые) вакцины против ОРВИ

[0560] изобретение включает композицию, содержащую инактивированный (или убитый) вирус ОРВИ и способы его получения. Инактивированный Вирусные композиции SARS могут быть использованы в качестве профилактических или терапевтических SARS вирусная вакцина. Предпочтительно инактивированная вакцинная композиция против вируса ОРВИ содержит некоторое количество инактивированного вируса ОРВИ, который, перед инактивацией, эквивалентен титру вируса от примерно 4 до 7 бревен образования бляшек единицы измерения (PFU) или от 4 до 7 бревен культуры ткани инфекционная доза 50 (TCID.SUB.50) на миллилитр. Более предпочтительно, перед инактивацией титр вируса составляет от 4 до 11, от 7 до 11 или от 9 до 11 PFU или TCID.SUB.50. Еще более предпочтительно инактивированная вакцинная композиция против вируса ОРВИ содержит количество инактивированного вируса торс, который перед инактивацией является эквивалентно титру вируса примерно от 5 до 9 PFU или от 5 до 9 TCID.SUB.50 на миллилитр. В одном варианте осуществления, PFU или TCID.SUB.50 из них культивируемый вирус ОРВИ при сборе урожая составляет от 6 до 8, более предпочтительно около 7,5 PFU или TCID.SUB.50 на миллилитр. При концентрации вируса урожай, PFU или TCID.SUB.50 предпочтительно от 8 до 11, еще больше предпочтительно около 9 PFU или TCID.SUB.50 на миллилитр. Вакцина композиция содержит достаточное количество антигена вируса ОРВИ к производят иммунологический ответ у приматов.

[0561] способы инактивации или уничтожения вирусов известны в области техники к уничтожьте способность вирусов заражать клетки млекопитающих. Такой методы включают в себя как химические, так и физические средства. Химические средства для инактивируя вирус атипичной пневмонии включают обработку вируса с эффективное количество одного или нескольких из следующих агентов: моющие средства, формальдегид, формалин, бета.-пропиолактон, или ультрафиолетовый свет. Дополнительный химические средства для инактивации включают обработку метиленовым синим, псорален, карбоксифуллен (С60) или их комбинация. Прочее методы вирусной инактивации известны в искусстве, такие как например бинарный этиламин, ацетилэтиленимин или гамма-облучение.

[0562] например формальдегид может использоваться в таких концентрациях, как 0,1 до 0,02%, предпочтительно на 0,02-0,1%, и еще более предпочтительно на 0,04 до 0,05%. Инактивирующий агент добавляется в вирусосодержащую культуру супернатанты, полученные до или после сбора супернатантов из указанной культуры сосуда, используемые для распространения вируса, либо с шагом клетки, либо без него нарушение высвобождения клеточно-ассоциированного вируса до сбора урожая. Кроме того, инактивирующий агент может быть добавлен после указанной культуры супернатанты хранились замороженными и размороженными, либо после одного или нескольких этапов очистки для удаления клеточных загрязнений. Предпочтительно, однако, формальдегид добавляется после удаления клеток и клеточного мусора или после один или несколько этапов очистки. После добавления формальдегида, вирус содержащая смесь переносится в инкубационный сосуд и инкубируется на температурах рефрижерации (например +2 до 8.степень. С.) или альтернативно в условиях повышенных температур, таких как температура окружающей среды между примерно 20 и 30.степень. С. или в 33 года.степень. С. до 37.степень. С. в течение периода от 12 часов до 7 дней, при котором выбранная температура должна быть настроены на продолжительность инкубации. Предпочтительные условия, например: +2-8.степень. С. На 3-7 дней (предпочитаемые 3-7days), температуры окружающей среды и инкубации в течение 16 часов до 3 дней (предпочтительно 24-48 часов), или 35-37.степень. С. На 12-36 часов. Если желательно убрать лишнее формалин, тиосульфат натрия или метабисульфит натрия на эквиволяре или Можно добавить 1,5-кратную молярную концентрацию (по отношению к формальдегиду). после завершения процесса инактивации.

[0563] например, бета.- пропиолактон может быть использован в концентрациях как 0,01 до 0,5%, предпочтительно на 0,5% до 0,2%, и все еще больше предпочтительно от 0,025 до 0,1%. К вирусу добавляется инактивирующий агент содержащие супернатанты культуры (вирусный материал) до или после сбор супернатантов указанной культуры из сосудов, используемых для заражения вирусом размножение, либо с шагом разрушения клетки для высвобождения, либо без него клетк-ассоциированного вируса до сбора урожая. Более потом, деактивировать агент может быть добавлен после того как упомянутые супернатанты культуры были сохранены замороженный и размороженный, или после одного или нескольких этапов очистки удалить клеточные загрязнения. бета.- к вирусному материалу добавляется пропиолактон, с неблагоприятным переносом в ПЭ-аш к кислотности будучи протоконтролированным с натрием гидроксид (например, 1 N NaOH), Трис-буфер или раствор бикарбоната натрия. После переноса смеси в другой инактивационный сосуд, то комбинированный инактиватор-вирусные материалы инкубируют при температурах с 4-го числа.степень. С. до 37.степень. С., Для инкубационных времен предпочтительно 24 до 72 часов.

[0564] еще одним инактиватором, который может быть использован, является бинарный этиленмин (BEI). Равные объемы 0,2 молярного раствора гидробромида бромэтиламина и 0,4 молярный раствор гидроксида натрия смешивают и инкубируют при - около 37.степень. С. На 60 минут. Полученный циклизованный инактиватор является бинарный этиленмин, который добавляют в вирусные материалы при температуре от 0,5 до 4 процент, и предпочтительно от 1 до 3 процентов, объем к объему. То инактивация вирусных материалов проводится примерно с 4.степень. С. to 37.степень. С. На 24 до 72 часа с периодическим взволнованием. В конце концов: это инкубация 20 мл. стерильного 1 молярного раствора тиосульфата натрия было добавлено, чтобы обеспечить нейтрализацию BEI.

[0565] в одном варианте осуществления изобретение включает способ инактивации предназначена для максимального воздействия вируса на инактивирующий агент и уменьшить долгосрочную выдержку температуры-чувствительного SARS вирусные частицы до повышенных температур. Изобретение включает в себя: способ инактивации, включающий воздействие на вирус путем инактивации агент (как BPL) на 12 до 24 часа на температурах рефрижерации с последующим гидролизом любого остаточного инактивирующего агента путем элевации температура держится всего 3 часа. Желательно, чтобы холодильная установка температура находится между 0 и 8.степень. С., более предпочтительно вокруг 4.степень. С. предпочтительно, повышенная температура между 33 и 41.степень. С., более предпочтительно около 37.степень. С. Как оценивалось с помощью теста для получения остаточного инфекционного вируса используют 10 мл инактивированных аликвот препарат, способный инактивировать SARS-CoV в сырой клетке урожайность культуры ниже теоретического предела 0,03 инфекционных единиц / мл.

[0566] разбавленные и неразбавленные образцы инактивированных вирусных материалов добавляются к восприимчивой клеточной (тканевой) культуре (например, VERO) для обнаружения любых неинактивированный вирус. Культивированные клетки пассируются многократно и исследуется на наличие вируса ОРВИ на основе любого из множества способы, такие как, например, цитопатическое действие (ЦПЭ) и антиген обнаружение (например, с помощью конъюгатов флюоросцентных антител, специфичных для ОРВИ вирус). Такие тесты позволяют определить полную инактивацию вируса.

[0567] перед инактивацией вирус торс будет культивироваться в среде а культура клеток млекопитающих. Клеточная культура может быть адгезивно растущими клетками или клетки, растущие в суспензии. Предпочтительно клетки млекопитающих происхождение, но также может быть получено из птичьих (например, куриных клеток, таких как эмбриональные клетки кур (CEF cells)), земноводных, рептилий, насекомых или Рыб источники. Млекопитающие источники клеток включают, но не ограничиваются ими, человек или нечеловеческий примат (например, MRC-5 (ATCC CCL-171), WI-38 (ATCC CCL-75), клетки HeLa, человеческие диплоидные клетки, фетальные клетки легкого резуса (например CL-160 ATCC), эмбриональные клетки почек человека (293 клетки, как правило трансформированные срезанной ДНК аденовируса типа 5), клетки VERO (например, из почки обезьяны), лошадь, корова (например, клетки MDBK), овца, собака (например, MDCK клетки из почек собаки, ATCC CCL34 MDCK (NBL2) или MDCK 33016, депозит номер DSM ACC 2219, как описано в WO 97/37001), кошка и грызун (например, клетки хомьяка как BHK21-F, клетки НКСС, или клетки завязи китайского хомьяка (Клетки CHO)), и могут быть получены от большого разнообразия превращая этапы, включая например, взрослый, неонатальный, фетальный, и эмбрион.

[0568] в некоторых вариантах осуществления клетки бессмертны (например, PERC.6 ячейки описаны, например, в WO 01/38362 и WO 02/40665, включенный ссылкой здесь в их всеохватности, так же, как депонируется под депозитным номером ECACC 96022940), или любой другой тип ячейки увековечен с использованием методов, описанных здесь.

[0569] в предпочтительных вариантах осуществления клетки млекопитающих используются, и могут быть выбранный и / или полученный из одного или нескольких из следующих вариантов не-ограничиваясь типы клетки: клетки фиброцита (например, дермальный, легкий), эндотелиальные клетки (например, аортальные, коронарные, легочные, сосудистые, кожные микрососудистые, пуповинные), гепатоциты, кератиноциты, иммунные клетки (например, Т-клетки, в-клетки, макрофаги, НК, дендритные), клетки молочной железы (например, эпителиальные), гладкомышечные клетки (например, сосудистые, аортальные, коронарные, артериальные, утробные, бронхиальные, цервикальные, ретиальные перидиты), меланоциты, нервные клетки (например, астроциты), простатические клетки (например, эпителиальные, гладкие мышца), почечные клетки (например, эпителиальные, мезангиальные, проксимальные каналцы), скелетные клетки (например, хондроцит, остеокласт, остеобласт), мышечные клетки (например, миоласт, скелетный, гладкий, бронхиальный), клетки печени, ретинобласты, и стромальные клетки. WO 97/37000 и WO 97/37001, инкорпорированные по ссылке здесь во всей своей полноте, опишите производство животных клеток и клеток линии которые способны к росту в подвесе и в свободных средах сыворотки и полезны при производстве и репликации вирусов.

[0570] предпочтительно, чтобы вирусы SARS изобретения выращивались на VERO клетки или фетальные клетки почки резуса.

[0571] условия культивирования для вышеуказанных типов клеток хорошо описаны в следующих работах: разнообразие публикаций, или альтернативно питательная среда, дополнения, а условия могут быть приобретены на коммерческой основе, например, как: описанные в каталоге и дополнительной литературе биопродукты Cambrex (East Rutherford, N. J.).

[0572] в некоторых вариантах осуществления, клетки хозяина используемые в методах описанные здесь культивируются в сыворотке свободных и / или белковых средах. Один средство названо а serum-free средство в контексте настоящее изобретение, в котором отсутствуют добавки из сыворотки крови человека или животное происхождение. Под безболочными понимаются культуры, в которых размножение клеток происходит с исключением белков, ростом факторы, другие добавки протеина и протеины поп-сыворотки. Ячейка выращивание в таких культурах естественно содержит сами белки.

[0573] известные среды без сыворотки включают среду Iscove, среду Ultra-CHO (BioWhittaker) или EX-CELL (JRH Bioscience). Обыкновенная сыворотка, содержащая средства включают средство Орла базальное (BME) или минимальное необходимое средство (MEM) (Eagle, Science, 130, 432 (1959)) или модифицированный Орел Дульбекко Средство (DMEM или EDM), которые обычно используются с икрой до 10% фетальной сыворотки или подобные добавки. Опционально, минимальная необходимая среда (MEM) (Eagle, Science, 130, 432 (1959)) или модифицированная Орлиная среда Дульбекко (DMEM или EDM) могут быть использованы без любой сыворотки содержа дополнение. Белковые среды, такие как PF-CHO (JHR Bioscience), химически

определенные среды как ProCHO 4CDM (BioWhittaker) или SMIF 7 (Gibco / BRL Life Technologies) и митогенные пептиды любят Примактон, Пептиказа или НуПер.ТМ. (все из Quest International) или гидролизат лактальбумина (Gibco и другие изготовители) также достаточно известны в предшествующем уровне техники. Средства массовой информации добавки на основе растительных гидролизатов имеют то особое преимущество, что заражение вирусами, микоплазмами или неизвестными инфекционными агентами может это исключено.

[0574] условия культивирования клеток, которые будут использоваться для желаемого применения (температура, плотность клетки, значение ПЭ-аш, ЕТК.) являются переменными в течение очень широкого ряда вследствие пригодности линии клетки используемой согласно изобретение также может быть адаптировано к требованиям вируса ОРВИ.

[0575] способ размножения вируса ОРВИ в культивируемых клетках (например, клетки млекопитающих) включает в себя этапы прививки культивируемых клеток с вирусом ОРВИ, культивируя зараженные клетки в течение желаемого периода времени для распространения вируса, например, как определено вирусом SARS титр или экспрессия антигена вируса атипичной пневмонии (например, между 24 и 168 часами после прививки) и сбора размноженного вируса. Культурные люди клетки прививают с вирусом атипичной пневмонии (измеренным PFU или TCID₅₀) к коэффициенту клетки 1: 10000 к 1: 10. Более низкий диапазон коэффициентов также может быть используется, например, от 1: 500 до 1: 1, предпочтительно от 1: 100 до 1: 5, более предпочтительно от 1: 50 до 1:10. Вирус ОРВИ добавляется в суспензию клеток или наносится к монослою клеток, и вирус поглощен на клетках для по крайней мере 60 минут но обычно меньше чем 300 минут, предпочтительно между 90 и 240 минут на 25.степень. С. - 40.степень. С., более предпочтительно 28.степень. С. до 37.степень. С., Еще более предпочтительно примерно в 33 года.степень. С. зараженная клеточная культура (например, монослои) может быть обработана либо путем замораживание-оттаивание или ферментативное действие для увеличения вирусного содержания собранная культура супернатантов. Собранные жидкости после этого являются либо инактивированный или сохраненный замороженный.

[0576] сравнение инфицированных ОРВИ клеток Vero, выращенных с и без них фетальная телячья сыворотка ("FCS") показана на фиг. 26а. Короче говоря, клетки Vero были расщепляют за день до заражения и культивируют в колбах T175. Инфекция из 90% слившихся монослоев клеток Vero на следующий день были выполнены с семенным материалом SARS-CoV (штамм FRA, пассаж 4, присоединительный номер AY310120), С или без 3% FCS (FIG. 26A). Добавление ФТС в состав клеточные среды показали незначительное влияние на выход вируса.

[0577] культивируемые клетки могут быть инфицированы при множественной инфекции ("m. o. i.") примерно 0,0001-10, предпочтительно 0,002-5, более предпочтительно до 0,001 - 2. Еще более предпочтительно, чтобы клетки были инфицированы в m. o. i примерно 0,01. Сравнение вирусного выхода при различных уровнях m. o. i. является показано на фиг. 26В.

[0578] инфицированные клетки могут быть собраны через 30-60 часов после заражения. Желательно, чтобы клетки собирали через 34-48 часов после заражения. Еще более предпочтительно, клетки собирают через 38-40 часов после заражения. Смотрите рис. 26С.

[0579] способы очистки инактивированного вируса известны в области техники и может включать один или несколько из них, например градиентное центрифугирование, ультрацентрифугирование, непрерывное ультрацентрифугирование и хроматография, как хроматография ионной реакции, исключение размера хроматография, и жидкостная хроматография средства. Дополнительный метод работы очищение включает ультрафильтрацию и диализфильтрацию. См. J P Gregersen "Herstellung von Virussimpfstoffen aus Zellkulturen" Chapter 4.2 в области Фармазеутизма биотехнологии (ред. О. Кайзер и Р. Н Мюллер) Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, 2000. Смотрите также, O'Neil и др., "Сбор вирусов и средство на основе жидкостной хроматографии. Один Способ концентрирования и очистки вирусов", Биотехнология (1993) 11: 173-177; Prior et al., "Отростчатая разработка Для изготовления Инактивированный ВИЧ-1", Фармацевтическая технология (1995) 30-52; и Majhdi et Аль., "Выделение и характеристика коронавируса из телят лося с диареей " журнал клинической микробиологии (1995) 35(11): 2937-2942.

[0580] другие примеры методов очистки, пригодных для использования в изобретение включает осаждение полиэтиленгликоля или сульфата аммония (см. Terpanier et al., "Концентрация синцитиальной дыхательной системы человека вирус, использующий сульфат аммония, полиэтиленгликоль или полое волокно ультрафильтрация " журнал вирусологических методов исследования (1981) 3(4): 201-211; Хаген и др., "Оптимизация процесса осаждения Поли(этиленгликоля) из Вирус гепатита используемый для того чтобы подготовить ВАКТА, сильно очищенное Инактивированное Вакцина " прогресс биотехнологии (1996) 12:406-412; и Carlsson et al., "Очистка инфекционного вируса панкреонекроза путем Анионообмена Хроматография повышает специфическую инфекционность " журнал вирусологии Методы (1994) 47:27-36), а также ультрафильтрация и микрофильтрация (см. Pau et al., Разработки в области биологической стандартизации (1985 год) 60: 171-174; Цуруми и др., "Представления структуры и фильтрации улучшенное полое волокно регенерированной целлюлозы сиргаммоний (улучшенное ВММ полое волокно) для удаления вирусов " журнал полимера (1990) 22 (12): 1085-1100; и Макино и др., "Концентрация живого ретровируса с регенерированным целлюлозное полое волокно, БММ", архив вирусологии (1994) 139(1-2):87-96.).

[0581] предпочтительно, вирус очищается с помощью хроматографии, такой как ионный обмен, хроматография. Хроматическое очищение учитывает производство больших объемов вирусосодержащей суспензии. Вирусная болезнь продукт, представляющий интерес, может взаимодействовать с хроматической средой простым способом механизм адсорбции / десорбции, и большие тома образца могут быть обрабатывается за одну загрузку. Загрязняющие элементы которые не имеют средства для адсорбент проходит через колонну. Материал вируса может после этого быть элюированные в концентрированном виде.

[0582] предпочтительные анионообменные смолы для использования в изобретении включают: DEAE, EMD ТМАЕ. Предпочтительные катионообменные смолы могут содержать сульфо - кислотно-модифицированная поверхность. В одном варианте осуществления вирус очищается с помощью Иона обменная хроматография, содержащая сильную анионообменную смолу (например EMD ТМАЕ) для первого шага и EMD-так.SUB.3 (катионообменная смола) для второй шаг. Металл-связывающая шаг хроматографии средства может по желанию включаются для дальнейшей очистки. (См., например, WO 97/06243).

[0583] предпочтительной смолой для использования в изобретении является Fractogel.ТМ-ЭМД. Эта синтетическая смола на основе метакрилата имеет длинные, линейные полимерные цепи (так называемые "щупальца") ковалентно прикреплены. Это " щупальце химии" позволяет для большого количества sterically доступных лигандов для связывание биомолекул без каких-либо стерических помех. Эта смола также имеет улучшенная стабильность давления.

[0584] еще одна предпочтительная жидкостная аффинная хроматография на основе колонок способ очистки для использования в изобретении. Один пример смолы для польза в этом методе очищения Matrex.ТМ-да. Cellufine.ТМ-сульфат. (МКС). MCS состоит из жесткого сферического (прибл. Диаметр 45-105 .mu.m) целлюлозная матрица предела исключения 3000 Дальтон (ее поровая структура исключает макромолекулы), с низкой концентрацией сложного эфира сульфата функциональность на 6-положении целлюлозы. Как функциональный лиганд (Эстер сульфата) относительно сильно рассеяна, оно представляет недостаточное катионная плотность заряда, позволяющая большинству растворимых белков адсорбироваться на поверхности поверхность шарика. Поэтому основная часть белка обнаружена в типичных вирусные пулы (супернатанты клеточных культур, например пирогены и большинство других загрязняющие белки, а также нуклеиновые кислоты и эндотоксины) являются вымывается из колонки и степень очистки от связанного вируса составляет достигнутый.

[0585] твердые, высокопрочные шарики MCS клонат сопротивлять обжатию. Характеристики давления / подачи смолаа MCS позволяет высокую линейную подачу тарифы позволяющая высокоскоростной обработке, даже в больших столбцах, делая им легко масштабируемая деятельность блока. В добавлении хроматографически ступень очистки с помощью MCS обеспечивает повышенную гарантию безопасности и стерильности продукта, избегая чрезмерной регуляции и безопасности продукта беспокойства. Поскольку эндотоксины не связываются с ним, этап очистки MCS позволяет быстрому и загрязняющему элементу свободно derugeneration. Нежная вязка и условия элюирования обеспечивают высокую производительность и выход продукта. Смола MCS поэтому представляет собой простой, быстрый, эффективный и экономичный способ для концентрации, очищения и депрогенирования. Кроме того, MCS смолы можно повторно использовать повторно.

[0586] инактивированный вирус может быть дополнительно очищен градиентом центрифугирование, предпочтительно центрифугирование градиента

плотности. Для коммерческий масштаб операции непрерывный поток сахарозы градиент предпочтительным вариантом было бы центрифугирование. Этот метод широко используется для очистки от противовирусных вакцин и известен специалист в этой области (см. J P Gregersen "Herstellung von Virussimpfstoffen aus Zellkulturen" Глава 4.2 В биотехнологии Фармазеутица (ред. О. Кайзер и R H Mueller) Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, 2000.)

[0587] стадия центрифугирования градиента плотности может быть выполнена с использованием оборудование центрифугирования градиента лаборатории или товарного масштаба. Для пример, отбрасывая Ротор ведра, фиксированный Ротор угла, или вертикальная пробка Ротор, в частности для продукции масштаба лаборатории вируса. Предпочтительно, стадия градиентного центрифугирования выполняется с использованием качающийся ковшовый Ротор. Этот тип Ротора имеет достаточно большую длину pathlength для того чтобы обеспечить высокомарочные разведения, в частности с многокомпонентные образцы. В добавлении, отбрасывая роторы ведра имеют значительно уменьшенные влияния стены, и содержание не переориентируют во время ускорение и замедление. Из-за их более длинной pathlength, разведения принимают более длиной сравненный к фиксированному углу или вертикальным роторам пробки. Подготовленные растворы сахарозы контролируют с помощью рефрактометра на их поверхности концентрация сахарозы.

[0588] градиенты сахарозы для центрифугирования градиента плотности, такие как в отбрасывая пробки центробежки ведра могут быть сформированы до центрифуги с помощью градиентного формирователя (непрерывного / линейного). Объем выборки что можно приложить к градиенту в отбрасывая трубке Ротора ведра а функция площади поперечного сечения градиента, который подвергается воздействию образец. Если объем выборки слишком велик, то его недостаточно радиальное расстояние в трубке центрифуги для эффективного разведения компоненты в многокомпонентном образце.

[0589] примерный объем пробы для качающегося ковшового Ротора SW 28 составляет 1-5 мл на пробирку (при диаметре пробирки 2,54 см). Образец приложен к градиенту путем пипетки Тома поверх градиента. Тулица конец пипетки помещают на 45-60 градус.степень, угол к стенке трубы, примерно на 2-3 мм выше градиента. Образец впрыснут медленно и позволено побежать вниз по стене пробки на градиент. После фракции градиента центрифугирования извлекаются путем тщательной вставки а калибруйте иглу до самого дна трубки и начинайте собирать фракции по 2 мл путем перекачивания жидкости из пробирки в соколиные трубки.

[0590] градиенты плотности сахарозы, пригодные для использования с этой плотностью этап очищения центрифугирования градиента включает 0-60%, 5-60%, 15-60%, 0-50%, 5-50%, 15-50%, 0-40%, 5-40%, и 15-40%. Предпочтительно, сахарозу градиент плотности составляет 15-40%, 5-40% или 0-40%.

[0591] в качестве альтернативы разрывный градиент плотности сахарозы может быть используется для очищения. Разрывная схема плотности сахарозы обеспечивает для дискретных, накладывающихся слоев различной концентрации сахарозы. В один пример, первый слой сахарозы 50% покрыт вторым слоем сахарозы. 40% сахарозы; второй слой покрыт третьим слоем 20% сахарозы; третий слой покрывается четвертым слоем 10% сахарозы; а третий слой-четвертым слоем сахарозы. четвертый слой покрывается раствором, содержащим вирус, который должен быть очищенный.

[0592] в одном варианте осуществления инактивированный вирус очищают методом состоит из первого этапа хроматографической очистки и второго этапа градиентного центрифугирования. Предпочтительно первая ступень содержит жидкость хроматография средства, как MCS. Желательно, на втором этапе включает центрифугирование градиента плотности используя отбрасывая Ротор ведра.

[0593] дополнительные методы очистки, которые могут быть использованы для очистки инактивированный вирус атипичной пневмонии включает применение нуклеиновокислотного деградирующего агента, предпочтительно фермент, разрушающий нуклеиновую кислоту, такой как нуклеаза, имеющая Деятельность при днказы и Рназы, или эндонуклеаза, как от Серраты marcescens, коммерчески доступный как Benzonase.TM., мембранные адсорберы с анионными функциональными группами (например Sartobind.TM.) или дополнительные хроматографические ступени с анионными функциональными группами (например, DEAE или TMAE). Ультрафильтрация / диалфильтрация и окончательный стерильный шаг фильтрации смогли также быть добавлены к методу очистки.

[0594] предпочтительно, очищение включает обработку SARS вирусного изолировать с помощью одного или нескольких ферментов деградации нуклеиновых кислот. Эти ферменты может использоваться для снижения уровня нуклеиновых кислот клеток хозяина в вирусной среде процесс очистки. Ферменты переваривания нуклеиновых кислот для использования в клетке культура известны в искусстве и включают, например, Benzonase.TM-да..

[0595] обработка вируса с ферментом нуклеиновой кислоты ухудшая а инактивирующий агент может быть выполнен путем последовательной обработки или в виде комбинированным или одновременным способом. Желательно, чтобы нуклеиновая кислота деградировала агент добавляется к вирусному препарату до добавления инактивирующий агент.

[0596] очищенный вирусный препарат изобретения по существу является не содержит загрязняющих белков, полученных из клеток или клеточной культуры и предпочтительно содержит менее чем около 1000, 500, 250, 150, 100, или 50 pg клеточный нуклеиновая кислота/. μ g антиген вируса, предпочтительно меньше, чем около 1000, 500, 250, 150, 100, или 50 pg клеточная нуклеиновая кислота / доза. Еще больше предпочтительно, чтобы очищенный вирусный препарат содержал менее 20 pg, и даже более предпочтительно, меньше чем около 10 pg. Способы измерения уровни нуклеиновых кислот клеток хозяина в вирусной пробе известны в искусстве. Стандартизированные методы, одобренные или рекомендованные регулирующими органами такие как ВОЗ или FDA являются предпочтительными.

[0597] изобретение включает инактивированную вакцинную композицию содержащее профилактически эффективное количество вирусного антигена SARS, предпочтительно Спайк или его иммуногенный фрагмент. ОПВИ вирусная антиген предпочтительно присутствует в количестве концентрации от 0,1 до 50 . μ g антиген / доза, более предпочтительно от 0,3 до 30. μ g антиген/доза. Еще более предпочтительно, антиген составляет около 15. μ g / доза.

[0598] в одном варианте осуществления более низкой концентрацией вирусного антигена SARS является применяют в инактивированных вакцинных композициях изобретения. Такие ниже вакцины концентрации могут выборочно включать адъювант для того чтобы форсировать иммунный ответ хозяина на антиген. При такой "низкой дозе" вакцины, то Вирусный антиген SARS предпочтительно присутствует в концентрации менее чем 15. μ g антиген/доза, (т. е. менее 10, 7,5, 5 или 3. μ g антиген / доза.

[0599] инактивированные вакцинные препараты по изобретению могут быть использованы дополнительно содержат стабилизатор для сохранения целостности иммуногенного вещества белки в инактивированном вирусном препарате. Стабилизаторы соответствующие для использование в вакцинах известны в области техники и могут включать, например:, буферы, сахара, спирты сахара, и аминокислоты. Стабилизирующие буферы являются предпочтительно отрегулируемый к физиологическому ряду ПЭ-аш и смогли включать фосфат буферы, буферы Tris, TE (Tris / EDTA), TEN (Tris/NaCl/EDTA) и Earle's солевой раствор. Стабилизирующие сахара могут включать, например, один или несколько сахарозы, глюкозы, фруктозы, декстранов, декстрансульфата, и трегалоза. Стабилизирующие сахарные спирты могут включать, например:, Ксилит / ксилитол, маннит / маннит, сорбит / сорбитол и глицерин. Аmino кислоты, пригодные для использования в изобретении, включают, например:, L-глутамин, аргинин, цистеин и лизин. Дополнительные стабилизаторы которые может быть использован в изобретении включают винную кислоту, Плуороник F 68, и Твин 80.

[0600] вирусные изоляты SARS, которые могут быть использованы для инактивации вируса препараты изобретения могут быть получены и идентифицированы любым из следующих способов: механизмы, описанные выше. Например, изолят атипичной пневмонии может быть полученный из клинического образца и очищенного зубного налета. Такие методы проведения вирусные выделения известны в искусстве.

[0601] дополнительные процедуры очистки могут быть применены для обеспечения семян вирус, используемый для приготовления вакцины, например, не содержит, нежелательные побочные вещества. В одном варианте осуществления вирусная РНК из вирусной изолят может быть выделен из вируса, очищен (и, необязательно последовательность проверяется с помощью ПЦР или другими средствами) и затем вводится в а подходящая культура клеток.

[0602] в качестве примера этого метода, клинический вирусный образец является бляшка очищенный и усиленный на клетках vero для того чтобы

произвести достаточное количество вирусная проба для анализа. Клеточные остатки затем очищаются от супернатант центрифугированием. Затем вирус может быть гранулирован с помощью ультрацентрифугирование и гранулы ресуспендировали в PBS. После того, как дальше центрифугирование очищение, вирус содержа часть обработано с DNase (и выборочно также RNase). Затем выделяют вирусную РНК из этой фракции и происходит трансфекция в клетку-хозяина.

[0603] Примеры 2 и 3 иллюстрируют процесс очищения инактивированный весь вирус SARS с использованием очистки смолы хроматографии MCS далее следует градиент плотности ультрацентрифугирования.

[0604] пути и методы иммунизации населения вакцинами против гриппа и ОРВИ изобретение более подробно обсуждается в разделе ниже. Примеры 4 и 5 приведите иллюстрации схемы иммунизации мышей с помощью инактивированный вирус ОРВИ изобретения.

В. Атенуированные вакцины против тора

[0605] изобретение включает композицию, содержащую ослабленное SARS вирус. Эта композиция может быть использована в качестве профилактического или лечебного средства при ОРВИ вирусная вакцина. Методы ослабления вирусов известны в искусстве. Такой методы включают последовательное прохождение вируса атипичной пневмонии в культивируемых клетках (например, культура клеток млекопитающих, предпочтительно фетальных клеток почек резуса или VERO клетки--см. обсуждение в разделе а выше относительно культуры SARS вирус), пока вирус атипичной пневмонии не продемонстрирует ослабленную функцию. То температура, при которой вирус выращивается, может быть любой температурой, при которой при прохождении культуры ткани происходит затухание. Ослабленная функция вирус SARS после одного или нескольких пассажей в культуре клеток может быть измерен одним искусным в этом деле человеком. Как использовано здесь, амортизация ссылается к снижена вирулентность вируса ОРВИ у человека-субъекта. Доза доказательства того, что ослабленная функция может быть показана уменьшенными уровнями вирусного репликация или уменьшенная вирулентность в животной модели.

[0606] другие способы получения аттенуированного вируса тора включают: прохождение вируса в клеточной культуре при неоптимальном или "холодном" состоянии" температуры и введение ослабляющих мутаций в ОРВИ вирусный геном путем случайного мутагенеза (например, химический мутагенез) или сайт специфический направленный мутагенез. Приготовление и генерация ослабленных Вакцины против РСВ (методы которых будут в основном применимы к ОРВИ вирус) раскрываются, например, в EP 0 640 128, U. S. Pat. Нет. 6,284,254, США Пат. No. 5,922,326, U. S. Pat. № 5.882651.

[0607] аттенуированные производные вируса тора образуются в нескольких случаях способы, такие как например, путем введения температуры чувствительность-мутации с химическим мутагенезом или без него (например, 5-фторурацил), путем прохождения в культуре при "холодных" температурах. Такой холод адаптация включает в себя прохождение при температурах около 20.степень. С. примерно до 32.степень. С., и предпочтительно между температурами около 22.степень. С. Примерно до 30.степень. С., и наиболее предпочтительно между температура около 24.степень. С. и 28.степень. С. холоддовая адаптация или амортизация может быть выполнена проходом на все больше и больше уменьшенном температуры для введения дополнительных мутаций ограничения роста. То количество проходов, необходимых для получения безопасного, иммунизирующего аттенуированного вируса зависит по крайней мере частично от используемых условий. Периодический тестирование культуры вируса атипичной пневмонии на вирулентность и иммунизирующую способность в животных (например, мышь, примат) могут легко определить параметры для а особое сочетание культуры тканей и температуры. Ослабленные вакцина, как правило, будет сформулирована в дозе от около 10.отхлбывать.От 3 до 10.отхлбывать.6 PFU или TCID.SUB.50, или больше для максимальной эффективности.

[0608] Атенуированные вирусные вакцины для ОРВИ также производятся путем создание вирусных химер, содержащих последовательности, полученные по меньшей мере из двух разные коронавирусы, одним из которых является ОРВИ. Например, вирус получена химера, содержащая гены, кодирующие неструктурный белок производный от первого коронавируса (например, мышинового, коровьего, свиного, собачьего, кошачий, птичий коронавируса) и один или более кодирующих структурных белков гены (например, Спайк, Е, М) от SARS-CoV. Как вариант, вирус химеры могут содержать последовательности, полученные из человеческого коронавируса, который является нет SARS-CoV (например, OC43, 229E) вместе с последовательностями от а Атипичная пневмония. Генерируются химерные коронавирусы настоящего изобретения с помощью различных методов, в том числе, например, учитывая естественную РНК рекомбинация в эукариотической (например, млекопитающей) клетке, содержащей РНК от каждого из родительских коронавирусов (например, после заражения) или путем используя стандартные методы молекулярной биологии известные к тому из искусства внутри искусство создавать желаемые вирусные химеры (или их части) в виде кднк клоны, которые затем могут быть использованы для производства инфекционного вируса (см. Для например, американский Пат. No. 6,593,111 B2; Yount et al., 2003, Proc. Natl. Acad. Sci. США 100(22): 12995-13000). Атенуированный фенотип человека описанные здесь химеры коронавируса могут быть легко измерены с помощью одного из следующих методов: мастерство в этом искусстве.

[0609] ослабленные вирусы также могут быть сгенерированы путем удаления одного или нескольких открытые рамки чтения (ORFs), которые не являются необходимыми для репликации вирусов. Предпочтительно, чтобы эти делеции происходили в структурной области генома, например, ORF 3a, 3b, 6, 7a, 7b, 8a, 8b, 9b. см., например, Haijema B J, Volders H, Rottier P J. J Virol. (2004) 78(8):3863-71; и de Haan, C. A., P. S. Masters, X. Shen, S. Weiss и P. J. Rottier, " the group-specific murine гены коронавируса не являются существенными, но их делеция, наоборот генетика, ослабляя в естественном хозяине."Вирусология (2002) 296:177-189. Удаление таких областей внутри коронавируса, как SARS может быть достигнуто, например, путем обратной генетики или " таргетирования рекомбинация "(см., например, Masters, P. S., " обратная генетика крупнейшие РНК-вирусы", ADV. Virus Res. (1999) 53:245-264.

[0610] методы очистки аттенуированного вируса известны в области техники и может включать один или несколько из них, например градиентное центрифугирование и хроматография. See Gregersen "Herstellung von Virussimpfstoffen aus Целлкультурен " глава 4.2 В Фармазеутичной биотехнологии (ред. O. Kayser and R H Mueller) Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, 2000.

С. отдельные вакцины против ОРВИ

[0611] изобретение включает композицию, содержащую расщепленный вирус ОРВИ рецептура и способы ее изготовления. Эта композиция может быть использована в качестве профилактической или терапевтической вакцины против вируса ОРВИ.

[0612] методы расщепления окутанных вирусов известны в данной статье. Способы расщепления оболочкавирусов раскрыты, например, в WO 02/28422, инкорпорированные в настоящем документе по ссылке в полном объеме, и в частности, включая описанные агенты расщепления и методы по ходу дела. Раскрыты способы расщепления вирусов гриппа, например: например, в WO 02/067983, wo 02/074336 и WO 01/21151, каждый из которых является инкорпорировано здесь по ссылке в полном объеме.

[0613] расщепление вируса осуществляется путем прерывания или фрагментирования весь вирус, инфекционный (дикого типа или ослабленный) или неинфекционный (например инактивированный), с нарушая концентрацией о расщепляющем агенте. Нарушение приводит к полному или частичному разрушению солибилизация вирусных белков, изменяющая целостность вирус.

[0614] предпочтительно, чтобы расщепляющий агент был неионным или ионным сурфактант. Соответственно, расколотые лекарственные формы вируса ОРВИ изобретение может также содержать по меньшей мере одно неионное поверхностно-активное вещество или моющее средство. Примеры расщепляющих агентов, полезных в изобретении, включают: желчные кислоты и их производные, неионные поверхностно-активные вещества, алкилгликозиды или алкилтиогликозиды и их производные, ацил сахара, сульфобетаины, бетаины, полиоксиэтиленалкилэфир, N,N-диалкил-Глюкамиды, Гекамег, алкилфеноксиполиэтоксиганолы, четвертичные аммониевые соединения, саркозил, СТАВ (цетилтриметиламмоний бромид) или Цетавлон.

[0615] предпочтительно ионное поверхностно-активное вещество является катионным моющим средством. Катионоактивный моющие средства, пригодные для использования в изобретении, включают в себя моющие средства содержит соединение следующей формулы: ## STR1##

[0616] где

[0617] R. sub.1, R. sub.2 и P. sub.3 такие же или различные и каждое обозначает алкил или Арил, или

[0618] R. sub.1 и P. sub.2, вместе с атомом азота к которому эти крепятся образуют 5-или 6-членное гетероциклическое кольцо, а также

[0619] R. sub.3 означает алкил или Арил, или

[0620] R. sub.1, R. sub.2 и P. sub.3 вместе с атомом азота к которые эти прикреплены, означают 5-или 6-членное гетероциклическое кольцо, ненасыщенный при атоме азота,

[0621] R. sub.4 обозначает алкил или Арил, и

[0622] X означает анион.

[0623] примерами таких катионных моющих средств являются цетилтриметиламмоний соли, такие как cetyltrimethylammonium bromide (СТАВ) и соль миристилтриметиламмония.

[0624] дополнительные катионные моющие средства, пригодные для использования в изобретении включите липофектин, липофектамин и DOT-MA.

[0625] неионогенные поверхностно-активные вещества, пригодные для использования в изобретении, включают: один или несколько выбранных из группы, состоящей из осту-или нонилфенокси полиоксиэтанола (например коммерчески доступные Серия Тритона), эстеры сорбитана полиоксиэтилена (серия Твин) и полиоксиэтиленовые эфиры или сложные эфиры общей формулы: O(CH.SUB.2CH.SUB.2O) n-A-R

[0626] где n-это 1-50, а-связь или --C(O)--, R-это C. sub.1-50 алкил или фенил C. sub.1-50 алкил; и комбинации из двух или больше из этих.

[0627] изобретение содержит способ получения расщепленного вируса ОРВИ содержащий контактировать вирус SARS с достаточным количеством расщепляющее средство для разрушения вирусной оболочки. Утрата целостности общества после расщепления вирус становится неинфекционным. Как-то раз нарушили вирусные белки оболочки, как правило, больше не связаны с целыми интактные вирионы, другие вирусные белки предпочтительно полностью или частично солиобилизованы и поэтому не связаны, или только частично связаны, с целыми неповрежденными вирионами после расщепления.

[0628] способ получения расщепленного вируса ОРВИ может дополнительно содержать удаление расщепляющих агентов и некоторых или большинства вирусных липидов материал. Процесс может также включать в себя ряд различных фильтрации и / или другие шаги разъединения как ultracentrifugation, ультрафильтрация, зональное центрифугирование и хроматографические стадии В а разнообразие комбинаций. Этот процесс также может необязательно включать в себя стадия инактивации (как описано выше), которая может быть выполнена до или после раскола. Процесс расщепления может быть выполнен в виде пакета, непрерывный, или полунепрерывный процесс.

[0629] сплит-вакцины вируса ОРВИ изобретения могут включать структурные белки, фрагменты мембран и белки оболочек мембран. Предпочтительно, расщепленные препараты вируса ОРВИ по изобретению содержат не менее половины из вирусных структурных белков.

[0630] один пример способа получения расщепленного вируса ОРВИ формулировка включает в себя следующие этапы:

[0631] (i) распространение вируса торс в культуре клеток, таких как MRC-5 клетки (ATCC CCL-171), WI-38 клеток (ATCC CCL-75), фетальная почка резуса клетки или клетки него (см. обсуждение в разделе А, выше, относительно культура вируса ОРВИ);

[0632] (ii) сбор содержащего вирус SARS материала из клетки Культура;

[0633] (iii) осветление заготавливаемого материала для удаления не-торс вирусный материал;

[0634] iv) концентрация собранного вируса торс;

[0635] (v) отделение всего вируса торс от невирусного материала;

[0636] (vi) расщепление всего вируса торс с использованием подходящего расщепления агент в ступени центрифугирования градиента плотности; и

[0637] (vii) фильтрация для удаления нежелательных материалов.

[0638] вышеуказанные шаги предпочтительно выполнять последовательно.

[0639] стадию осветления предпочтительно проводить центрифугированием на умеренной скорости. Альтернативно, шаг фильтрации может быть использован для пример с мембраной 0.2 .mu.m.

[0640] на стадии концентрирования предпочтительно может использоваться адсорбционный метод, например, с помощью CaHPO.SUB.4. В качестве альтернативы может использоваться фильтрация, например, ультрафильтрация.

[0641] дальнейшая стадия разделения может также использоваться в методе: изобретение. Этот дальнейший шаг разделения предпочтительно является зональным разделение центрифугированием, а также может дополнительно использовать градиент сахарозы. То градиент сахарозы может дополнительно содержать консервант для предотвращения микробной инфекции рост.

[0642] шаг расщепления также может быть выполнен в градиенте сахарозы, где градиент сахарозы содержит расщепляющий агент.

[0643] этот метод может дополнительно содержать стадию стерильной фильтрации, необязательно в конце процесса. Желательно, чтобы там был Ан шаг инактивации перед заключительным шагом фильтрации.

[0644] способы получения расщепленных вирусных формул SARS могут быть использованы дополнительно включите обработку вирусного образования с энзимом ДНК усваивая. Эти энзимы могут быть использованы для уменьшения уровня ДНК клетки хозяина в процесс вирусной очистки. Ферменты переваривания ДНК для использования в культуре клеток известны в этом искусстве и включения, например, Бензоназы.РТМ..

[0645] обработка рецептуры вируса торс с перевариванием ДНК энзим может произойти в любое время в процессе очищения и разделения. Предпочтительно, однако, чтобы формулировка вируса ОРВИ была обработана ДНК переваривающий фермент перед использованием моющего средства. Еще более предпочтительно, чтобы Образование вируса SARS обработано с энзимом дна усваивая, как Бензоны, перед обработкой с катионоактивным тензидом, как СТАВ.

[0646] методы очистки расщепленного вируса известны в ст. См. J P Gregersen "Herstellung von Virussimpfstoffen aus Zellkulturen" Chapter 4.2 В Фармазеутище биотехнологии (ред. О. Кайзер и Р. Н Мюллер) Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, 2000.

[0647] изобретение включает разделенную вакцинную композицию, содержащую а профилактически эффективное количество вирусного антигена SARS, предпочтительно Спайка или его иммуногенный фрагмент. Вирусный антиген SARS предпочтительно присутствует в количестве концентрации от 0,1 до 50 .мг.г антигена/дозы, более предпочтительно от 0,3 до 30 .мг.г антиген/доза. Еще более предпочтительно, чтобы антиген составляет около 15. мг. г / доза.

[0648] в одном варианте осуществления более низкой концентрацией вирусного антигена SARS является используемые в расщепленных вакцинных композициях изобретения. Такие ниже вакцины концентрации могут выборочно включать адьювант для того чтобы форсировать иммунный ответ хозяина на антиген. При такой "низкой дозе " вакцины, то Вирусный антиген SARS предпочтительно присутствует в концентрации менее чем 15.мг. г антиген/доза, (т. е. менее 10, 7,5, 5 или 3. мг.г антиген / доза.

D. субъединица вакцин от ОРВИ

[0649] изобретение включает композицию, содержащую изолированный или очищенный вирусный антиген ОРВИ или его производное. Состав может: далее включают один или несколько адьювантов.

[0650] вирусные антигены SARS могут быть выделены или очищены от вируса SARS выращивается в клеточной культуре. Альтернативно, антигены SARS вирусные могут быть рекомбинантно производится методами, известными в данной области техники.

[0651] вирусные антигены SARS, используемые в изобретении, могут быть получены в виде разнообразие различных систем выражения, которые известны в искусстве; для пример те используемые с клетками млекопитающих, бакуловирисами, бактериями, и дрожжи. Такие экспрессионные системы обычно используют полинуклеотиды кодирование вирусных антигенов изобретения. Такие последовательности могут быть полученные с использованием стандартных методов молекулярной биологии, в том числе перевод аминокислотных последовательностей, перечисленных здесь. Соответственно, изобретение включает в себя полинуклеотиды, кодирующие вирусные антигены вида изобретение. Кроме того, вирусные антигены данного изобретения могут быть производится (по крайней мере частично, предпочтительно целиком) с помощью синтетической химии методы.

[0652] системы экспрессии клеток насекомых, такие как бакуловирусные системы, являются известный тем, кто обладает навыком в этом искусстве и описанный, например, Летом и Смит, Техас Сельскохозяйственная Экспериментальная Станция Бюллетень № 1555 (1987). Материалы и способы для систем экспрессии бакуловируса/инсера клеток являются коммерчески доступный в форме набора от, в частности, Invitrogen, Сан Диего Калиф. Аналогичным образом, бактериальные и млекопитающие системы экспрессии клеток также известны в искусстве и описаны, например, генетические дрожжи Инжиниринг (Bart et al., ЭЦП., 1989) Баттеруортс, Лондон.

[0653] ряд подходящих клеток хозяина для использования с вышеуказанными системами также известны такие случаи. Например, линии клеток млекопитающих известны в искусстве и включают бессмертные клеточные линии, доступные из американского типа Коллекция культуры (ATCC), например, но не ограничиваясь этим, китайский хомяк клетки яичника (CHO), клетки HeLa, клетки почки хомячка младенца (ВНК), обезьяна клетки почки (например, гепатит G2), клетки почки madin-Darby bovine ("MDBK"), как ну и другие тоже. Млекопитающие источники клеток включают, но не ограничены для человека или нечеловеческого примата (например, MRC-5 (ATCC CCL-171), WI-38 (ATCC CCL-75), фетальные клетки легкого резуса (ATCC CL-160), почка людского зародыша клетки (293 клетки, обычно трансформированные срезанным аденовирусом типа 5 ДНК), клетки VERO из почек обезьяны), лошади, коровы (например, клетки MDBK), овцы, собаки (например, клетки MDCK из почек собаки, ATCC CCL34 MDCK (NBL2) или MDCK 33016, номер депозита DSM ACC 2219 как описано в WO 97/37001), кошка и грызун (например, клетки хомяка, такие как ВНК21-Е, клетки НКСС, или Клетки яичника китайского хомяка (клетки Чо)), и могут быть получены от широкого разнообразие стадий развития, включая, например, взрослую, неонатальную, зародыш и эмбрион.

[0654] точно так же бактериальные хозяева, такие как *E. coli*, *Bacillus subtilis* и *Streptococcus spp.*, найдёт применение с настоящими конструкциями выражения. Дрожжевые хозяева, полезные в настоящем изобретении, включают, в частности, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, *Candida maltosa*, *Yarrowia lipolytica*, *Kluyveromyces fragilis*, *Kluyveromyces lactis*, *Pichia guilliermondii*, *Pichia pastoris*, *Schizosaccharomyces pombe* и *Yarrowia lipolytica*. Клетки насекомых для использования с векторами экспрессии бакуловируса среди них, в частности, *Aedes aegypti*, *Autographa californica*, *Bombyx mori*, *Drosophila melanogaster*, *Spodoptera frugiperda* и *Trichoplusia ni*.

[0655] молекулы нуклеиновых кислот, содержащие нуклеотидные последовательности вирусные антигены или антители по изобретению могут быть стабильно интегрированы в геном клетки хозяина или поддержанный на стабилизированном эписомальном элементе в а соответствующая клетка хозяина используя различные методы доставки гена известные внутри искусство. Видеть, например, американский Пат. № 5 399 346.

[0656] в зависимости от выбранной системы выражений и хоста, то молекулы произведены путем расти клетки хозяина преобразованные выражением вектор при условиях, при которых белок экспрессируется. Выраженное в словах: затем белок выделяют из клеток хозяина и очищают. Если система выражения делает протеин секретным в среды роста, продукт может очистить сразу от средств массовой информации. Если она не секретируется, то может быть выделен из клеточных лизатов. Выбор соответствующего роста условия и методы восстановления находятся в пределах мастерства этого искусства.

[0657] изобретение включает композицию, содержащую изолированный или очищенный вирусный антиген ОРВИ или его производное. Изобретение также включает композицию, содержащую по меньшей мере два изолированных или очищенных тора вирусные антигены или их производные, которые были совместно очищены или очищенный отдельно и после этого совмещенный. В одном варианте осуществления ОРВИ вирусная антиген-это спайковый (s) белок. В еще одном варианте осуществления, тора вирусный антиген представляет собой белок нуклеокапсида (N), мембранный (M) гликопротеин, или белок оболочки (Е). Предпочтительно, вирусный антиген SARS присутствует внутри состав в чистоте более 75% (например, 78%, 80%, 82%, 85%, 88%, 90%, 92%, 95%, 98%).

[0658] изобретение включает вакцинную композицию, содержащую а профилактически эффективное количество вирусного антигена SARS, предпочтительно Спайка или его иммуногенный фрагмент. Вирусный антиген SARS предпочтительно присутствует в количестве концентрации от 0,1 до 50 .мг.г антигена/дозы, более предпочтительно от 0,3 до 30 .мг.г антиген/доза. Еще более предпочтительно, чтобы антиген составляет около 15. мг. г / доза.

[0659] в одном варианте осуществления более низкая концентрация вирусного антигена SARS является используется в вакцинных композициях изобретения. Такая более низкая концентрация вакцины могут дополнительно содержать адьювант для усиления иммунитета хозяина реакция на антиген. В такой "низкой дозе " вакцины, как тора вирусный антиген предпочтительно присутствует в концентрации менее 15. мг. г антиген / доза, (т. е. менее 10, 7,5, 5 или 3. мг.г антиген/доза.

[0660] в следующем примере показан способ получения атипичной пневмонии вирус Спайк (BI) белковая субъединица вакцины.

[0661] антиген вируса атипичной пневмонии S может быть выделен и очищен из различных источников и с использованием различных методов, в том числе, но не ограничиваясь ими, Антиген S экспрессируется в культивируемых эукариотических клетках (например, клетках млекопитающих, например, VERO, CHO) или бактерии (например, *E. coli*). Выражение может быть достигается это различными средствами, такими как, например, от вируса ОРВИ инфицированная клеточная культура или супернатанты клеточных культур из культивируемых клеток стабильно трансформируется с помощью экспрессионной кассеты ДНК, кодирующей вирус SARS Белок S (например, промотор РНК-полимеразы II, функционально связанный с атипичной пневмонией ген вируса S), или из культивированных клеток, инфицированных а репликация-компетентное или репликация-некомпетентное вирусное выражение вектор (например, вектор аденовируса, вектор поксвируса, вектор альфавируса, ретровирусный вектор), кодирующий белок вируса атипичной пневмонии S, в качестве средства для исключите необходимость работы с инфекционным вирусом ОРВИ.

1. Субъединичные вакцины против ОРВИ, полученные из культур вируса ОРВИ

[0662] вирус торс может быть выращен в культивируемых клетках млекопитающих, таких как Клетки VERO, после этого отделенные от культивированных клеток. Вирусный антиген ОРВИ, как протеин S, смогите после этого быть солюбилизовано и отделено от Вирус торс, а также дополнительно выделяют и очищают.

[0663] в одном примере вирус SARS может быть произведен так, как описано в Инактивированные примеры вакцины против ОРВИ, затем желаемый антиген ОРВИ, такие как спайковый белок, может быть дополнительно очищен от конечного продукта с помощью приемы, известные в искусстве.

[0664] в другом примере субъединица вакцины торс может быть произведена в виде следует. Вирус SARS может быть получен с использованием желаемой линии клеток млекопитающих на шариках микроносителя в больших, контролируемых ферментаторах. Например, качество вакцины клетки почки африканской зеленой обезьяны (клетки VERO) на а концентрация 10.отхлебывать.5 клеток / мл добавляют к 60-75 л CMRL 1969 среды, pH 7,2, в биореакторе объемом 150 л, содержащем 360 г Цитодекса-1 микроноситель отбортовывают и перемешивают в течение 2 часов. Добавлен дополнительный CMRL 1969 для получения суммарного объема 150 л. фетальная бычья сыворотка (FBS) добавляется к а конечная концентрация 3,5%. Глюкоза добавляется в конечную концентрацию 3,0 г / л и глутамин добавляют к конечной концентрации 0,6 г / л. Растворенный кислород, ПЭ-аш, взволнование и температура проконтролированы, и клетка контролируются уровни роста, глюкозы, лактата и глутамина. Когда клетки находятся в логарифмических фазах обычно на 3-4-е сутки достигают плотности примерно 1,0-2,5.раз.10.отхлебывать.6 клеток / мл, культуральная среда стекают от ферментатор и 120 л CMRL 1969, pH 7.2 (без FBS) добавляют и растворяют. культуру перемешивали в течение 10 минут. Слив и наполнение ферментора обычно повторяется один раз, но может повторяться до трех раз. После промыв клетки, ферментор сливают и 50 л CMRL 1969 добавлено содержание 0.1% (v/v) FBS. Инокулом вируса ОРВИ добавляется при а кратность заражения (m. o. i.) от 0,001 до 0,01. Трипсин может быть добавлен чтобы способствовать эффективной инфекции. Дополнительный CMRL 1969 с 0,1% FBS является добавляют для придания окончательного объема 150 л. инкубацию продолжают при 34 C. Одна вирусная жатва получена от одиночной серии ферментора, типично на 2-7 дней после заражения. Множественные урожаи от одиночной заквашивания могут также можно получить.

[0665] выделение и очистка белка S может осуществляться с помощью а разнообразие средств, как описано ниже. Например, сбор S белоксодержащий проточный материал из ионообменной хроматографии солюбилизованные белки оболочки вируса атипичной пневмонии; загрузка потока до конца на а матрица гидроксипатита, и выборочно элюирующ протеин С от гидроксипатитовая матрица. Селективно элюированный белок S может быть и дальше концентрируется методом тангенциальной проточной ультрафильтрации.

[0666] альтернативно, изоляция и очищение могут быть произведены мимо сбор s белоксодержащего потока из ионного обмена хроматография солюбилизованных белков оболочки вируса ОРВИ; загрузка подача до конца на матрицу гидроксипатита и собирать с белоксодержащий поток, проходящий через него, избирательно удаляющий моющее средство, используемое в нем стадия солюбилизации от потока гидроксипатитовой матрицы до полного растворения обеспечьте изолированный и очищенный белок S. Изолированный и очищенный S протеин может быть затем сконцентрирован касательной подачей ультрафильтрация

[0667] загрязнители нуклеиновых кислот могут быть удалены из выделенных и очищенный белок S обработкой с агентом нуклеиновой кислоты разлагающим как описано выше в разделе инактивация. Предпочтительно, нуклеиновая кислота деградирующим агентом является нуклеаза, такая как, например, Бензоназа.

[0668] выделенный и очищенный белок S может быть нанесен на гель средство фильтрации и протеин S затем собранные там к отделите протеин S от загрязняющих элементов других молекулярных Весов.

[0669] альтернативно, изоляция и очищение могут быть произведены путем загрузка белка S на первую ионообменную среду при одновременном обеспечении возможности загрязняющие элементы, котор нужно пройти через средство, элюируя протеин S от первая ионообменная среда, для того чтобы отделить протеин S от загрязняющих элементов другие молекулярные массы. Элюированный белок S наносится на второй средство ионного обмена пока позволяющ загрязняющ элементам пройти через вторая ионообменная среда. Протеин S затем элюируется оттуда, обеспечьте изолированный и очищенный протеин S. The eluted S белок можно концентрировать путем тангенциальной проточной ультрафильтрации.

[0670] альтернативно, существенно чистый белок вируса S SARS соответствующий для использования в качестве иммуногена в субъединице может быть приготовлена вакцинальная композиция из инфицированных клеточных лизатов, таких как, например, использование неденатурирующего препарата детергентный буфер, содержащий 1% Тритон x-100 и дезоксихолат в лизат инфицированная клетка. Лизаты клеток осветляются центрифугированием и S белок очищается от клеточных лизатов методом иммуноаффинной очистки. Моноклональное антитело против протеина S произведено и соединено к бусины и колонка построены с этими бусами. SARS-инфицированная клетка лизаты наносятся на колонку, и колонка промывается с помощью PBS содержит 0,1% Тритон x-100. Протеин связанный к колонке элюирован с 0,1 м глицин, pH 2,5, 0,1% Тритон x-100. Элюционные образцы буферизуются, такие как, например, с Трис, и анализируются на наличие белка. Фракции, содержащие белок, объединяются и диализируются против PBS

[0671] как обсуждалось выше, настоящее изобретение включает изолированные и очищенный белок S вируса ОРВИ. В одном примере вирус выращивается на а вакцинальная качественная клеточная линия, такая как клетки VERO, и выращенный вирус-это собранный. Урожай вируса фильтруется и затем концентрируется обычно использование тангенциальной проточной ультрафильтрации с использованием мембраны желаемого типа молекулярная масса отсекается и диафильтруется. Концентрат для сбора вируса возможно центрифугирование и удаление супернатанта. Лепешка от the центрифугирование после этого тензид извлеченный для того чтобы солюбилизовать протеин С., например, путем ресуспендировать лепешку к первоначально хлебуборке объем концентрата в экстракционном буфере, содержащем моющее средство, такое как неионное моющее средство, включая TRITON X-100.

[0672] после центрифугирования для удаления нерастворимых белков, S белковый экстракт очищают хроматографическими процедурами. Экстракт может быть сначала нанесен на ионообменную хроматографическую колонку, такую как а Колонка TMAE-fractogel или S-fractogel уравновешенная для того чтобы позволить протеин S пропустить до конца пока примеси сохранены на колонке.

[0673] затем поток может быть загружен на колонку гидроксипатита, уравновешивается для обеспечения связывания белка S с матрицей и для того, чтобы позволте загрязняющим элементам пройти от колонки. Связанный протеин S после этого элюированный от колонки соответствующим elutant. Полученный очищенный продукт раствор белка S может быть дополнительно обработан для повышения его чистоты. Элюат сначала можно концентрировать путем тангенциальной ультрафильтрации потока использование мембраны с требуемой молекулярной массой отсекается. Фильтрат может быть: контактирует с полиэтиленгликолем желаемой молекулярной массы, например например, около 6000 до 8000, чтобы осадить белок. Следующий центрифугирование и сброс супернатанта, лепешка могут быть ресуспендируют в PBS и диализируют для удаления полиэтиленгликоля. Наконец, диализированный раствор белка S может быть стерильно отфильтрован. То стерильный фильтрованный раствор может быть адсорбирован на квасцы. Полиэтилен стадия осаждения гликоля и ресуспензионной очистки может быть осуществлена на более ранней стадии операции очистки, при желани.

[0674] альтернативно, вирус SARS взят после роста и заготовка вируса, а также концентрата полученного таким как, например используя высыпание шпенька или тангенциальную фильтрацию подачи. Вирус есть контактируйте с тензидом для того чтобы солюбилизовать протеины S. Следующий центрифугирование, супернатант восстанавливается для дальнейшей очистки от белок S и нерастворимые белки отбрасываются.

[0675] супернатант применяется для ионообменной хроматографии колонка, такая как TMAE-фрактогель или колонка S-фрактогеля, подходяще уравновешено, чтобы позволить удержание белка S на колонке. The S белок элюируется из ионообменной колонки при соответствующих условиях. Элюат после этого может быть пропущен через колонку фильтрации геля, как а Колонка сефакрила C-300, отделить протеин С от загрязняющих элементов другие молекулярные массы. Колонка гидроксипатита может быть использована на месте из колонны Сефакрила.

[0676] белок S может быть элюирован из колонки для получения очищенного продукта. раствор белка S. Элюат может быть сконцентрирован

тангенциальным потоком ультрафильтрация с использованием мембраны с заданной молекулярной массой отсеечения. То концентрированный раствор белка S затем может быть стерильно отфильтрован.

[0677] альтернативно, вирусные урожаи могут быть сконцентрированы мимо ультрафильтрации и концентрированным вирусным сбором могут подвергаться начальной стадии очистки, например, путем гелевой фильтрации хроматография, осаждение полиэтиленгликоля или сульфат целлюлозы хроматография. Очищенный вирус может после этого быть детергентным извлеченным к солибилизовать белок S. После солибилизации протеина S, супернатант может быть загружен на ионообменную колонну, такую как Cellufine колонка хроматографии сульфата уравновешенная для того чтобы позволить протеин связать к колонке пока позволяющим загрязняющим элементам пропустить до конца. Аналогично, а Колонка TMAE-fractogel или S-fractogel может быть использована вместо Колонка сульфата целлюлозы. Эти два столбца также могут быть объединены в последовательные этапы очистки. Белок S элюируется из колонок чтобы обеспечить очищенный раствор белка. Это решение может быть: концентрируется методом тангенциальной проточной ультрафильтрации с использованием мембраны из желаемая молекулярная масса отсеки и диафильтрации.

[0678] в частности, в одном из способов очистки белка S, вирус сбор концентрата центрифугируют при 28000.раз.г в течение 30 минут при 4 К. супернатант сброшен и лепешка ресуспендирован в извлечении буфер, состоящий из 10 мм Трис-HCl, pH 7,0, 150 мм NaCl, 2% (Вт/в) Тритона X-100 к первоначальному объему концентрата урожая. Refabloc добавляется к а конечная концентрация 5 мм. суспензию перемешивают в помещении температура в течение 30 минут. Супернатант, содержащий растворимый S белок, осветленный центрифугированием при 28000.раз.г в течение 30 минут при 4 К. колонка TMAE -- Фрактогеля уравновешивается 10 мм Трис-HCl, pH 7,0, 150 мм NaCl содержа 0.02% Triton X-100. The Triton X-100 надосадочная жидкость, содержащая растворимый белок S, загружается непосредственно на колонна ТРЕФРАКТОГЕЛЯ. Общий добавленный объем плюс 2 койко Тома 10 мм Трис-HCl, pH 7,0, 150 мм NaCl, содержащий 0,02% Тритона x-100 являются собранный. Поток-через TMAE-Фрактогель содержа протеин S является разбавленный в 3 раза 10 мм Трис-HCl, pH 7,0, содержащий 0,02% Тритона X-100.

[0679] колонка гидроксиапатита уравновешивается 10 мм Трис-HCl, pH 7,0, 50 мм NaCl, 0.02% Тритон x-100. После загрузки TMAE проточной части, колонку промывают с 2-мя колонными объемами по 10 мм Трис-HCl, pH 7,0, 50 мм NaCl, 0,02% Тритон x-100 с последующим 4-столбчатый объемом 5 мм натрия фосфат, pH 7,0, 1M NaCl, 0,02% Тритон x-100. Белки элюируются с 4 объемами колонки 20 мм фосфат натрия, pH 7,0, 1M NaCl, 0,02% Тритон X-100. Фракции собираются на основе A280 и белка измеряют содержание и концентрацию антигенов. Очищенный белок S ультрафильтруется методом тангенциальной проточной ультрафильтрации с использованием 300 КДА НМВТ мембрана.

2. Рекombинантное получение субъединиц вакцин против ОРВИ

[0680] как обсуждалось выше, белки вируса атипичной пневмонии могут быть получены путем рекombинантное выражение. Клетки-хозяева, пригодные для рекombинантной экспрессии включите бактериальное, млекопитающее, насекомое, дрожжи и т. д. Рекombинантная экспрессия может использоваться для получения полноразмерного белка SARS, его фрагмента, или слияние с ним.

[0681] пептиды сплавливания могут быть использованы для того чтобы облегчить выражение и очистка рекombинантного белка SARS. Например, рекombинантный продукция полипептидов SARS может быть облегчена добавлением а белок метки к антигену атипичной пневмонии, который должен быть выражен как белок слияния содержащ протеин бирки и антиген SARS. Такие протеины бирки могут облегчить очищение, обнаружение и стабильность выраженного белок. Белки тега, пригодные для использования в изобретении, включают в себя бирка полиаргинина (Arg-бирка), бирка полигистидина (His-бирка), флаг-бирка, Strep-tag, c-мус-tag, S-tag, кальмодулин-связывающий пептид, целлюлозосвязывающий домен, SBP-tag, хитиновосвязывающий домен, глутатион S-трансфераза-tag (GST), мальтозсвязывающий белок, транскрипция терминальный анти-терминальный фактор (NusA), тиоредоксин E. coli (TrxA) и изомераза I дисульфида протеина (DsbA). Предпочитаемые протеины бирки включают Ego-тэг и GST. Полная дискуссия по использованию tag белков может быть найдено в Terpe et al., "Обзор сливающий белков тегов: от молекулярных и биохимические фундаменталы к коммерческим системам", Appl Microbiol Biotechnol (2003) 60:523-533.

[0682] после очистки белки метки могут быть дополнительно удалены из экспрессированного белка слияния, т. е. с помощью специально подобранного ферментативные методы лечения известны в искусстве. Обычно используемые протеазы включают в себя энтерокиназа, вирус табачного травления (TEV), тромбин и фактор X. sub.есть

[0683] соответственно, изобретение дополнительно включает субъединицу вируса торс вакцина, содержащая белок слияния. Предпочтительно, слияние белков содержит первую аминокислотную последовательность, кодируемую вирусом SARS полинуклеотидная последовательность. Полинуклеотидные последовательности вируса атипичной пневмонии, которые могут кодируете упомянутую первую аминокислотную последовательность, включающую один или несколько из SARS вирусные полинуклеотидные последовательности, идентифицированные в этом приложении и фрагменты его.

[0684] белок слияния может содержать аминокислотную последовательность атипичной пневмонии вирусный белок или его фрагмент. Указанный белок вируса ОРВИ может быть выбирается из одной или нескольких групп, состоящих из следующих атипичных состояний белки вируса: P28, P65, Nsp1, nsp2 (протеаза 3CL), Nsp3, Nsp3, Nsp4, Nsp 5, Nsp6, Nsp 7, Nsp 8, Nsp 9 (PHK-полимераза), Nsp 10 (геликаза), Nsp 11, Nsp 12, Nsp 13, Spike, Orf 3, Orf 4, Огибающая, Матрица, Orf7, Orf8, Orf9, Orf10, Orf11, нуклеокапсид и Orf13.

[0685] в одном варианте осуществления синтезированный белок содержит первую аминокислоту последовательность, содержащая антиген вируса ОРВИ или его фрагмент. Сказал SARS аминокислотная последовательность вируса может содержать один или несколько Т-эпитопов последовательности, указанные выше.

[0686] предпочтительно, протеин сплавливания содержит последовательность аминокислоты спайковый белок вируса ОРВИ или его фрагмент. Конкретные фрагменты из протеин шипа который может быть использован в протеине сплавливания включает С1 домен и домен S2. Более дополнительные части протеина шипа который сможете быть использовано в протеине сплавливания включите зоны каждого из S1 и Домены S2, включая рецепторную связывающую область домена S1, то олигомеризация доменных областей домена S2, лейциновая молния области домена S2, мембранная анкерная область домена S2, гидрофобная доменная область домена S2, богатая цистеином область область домена S2, а также цитоплазматический хвост области S2 домен. (См. рис. 19). Аминокислотные последовательности спайкового белка соответствующие этим регионам могут быть определены теми, кто квалифицирован в области искусство, в том числе, например, с использованием функциональных прогнозов, изложенных ранее в приложении (предсказанные трансмембранные спирали, предсказанные N-концевые сигнальные области, прогнозируемые области спиральных катушек и т. д.) как а также путем сравнения гомологий с последовательностями других известных Коронавирусы (см. фиг. 4F и 5).

[0687] белок слияния может дополнительно содержать вторую аминокислоту последовательность. Указанная вторая аминокислотная последовательность может содержать полипептид последовательность, которая облегчает экспрессию или очищение белка, предпочтительно одна из последовательностей тегов, рассмотренных выше. Альтернативно, сказал второй аминокислотная последовательность может содержать вторую аминокислотную последовательность из атипичной пневмонии вирус. В качестве альтернативы, указанная вторая аминокислотная последовательность может содержать аминокислотная последовательность от другого вируса или бактерии, включая один или несколько вирусов или бактерий, идентифицированных в разделе I ниже.

[0688] указанная вторая аминокислотная последовательность может содержать аминокислоту последовательность от другого респираторного вируса. Указанная вторая аминокислотная последовательность может содержать аминокислотную последовательность из вируса, выбранного из группы состоит из коронавируса, вируса гриппа, риновируса, парагриппа вирус (PIV), респираторно-синциальный вирус (RSV), аденовирус и метапневмовирус.

[0689] в одном варианте осуществления указанная вторая аминокислотная последовательность может содержать аминокислотная последовательность от адьюванта, включая один или несколько из следующих компонентов: адьюванты, указанные в разделе I ниже.

[0690] в одном варианте осуществления изобретение включает синтез белка содержащая аминокислотную последовательность спайкового белка вируса ОРВИ или а фрагмент его. Белок слияния может дополнительно содержать второй аминокислотная последовательность, содержащая аминокислотную

последовательность, выбранную из группы состоит из второго вирусного белка SARS, не-вирусного белка SARS, а бактериальный белок и адъювант.

а) бактериальная экспрессия субъединиц вакцин против ОРВИ

[0691] в одном варианте осуществления бактериальные клетки хозяина использованы для рекомбинантного экспрессии белков вируса ОРВИ. Бактериальные клетки хозяина соответствующие для пользы в изобретение входят, например, *E. coli*, *Bacillus subtilis*, а также *Streptococcus spp.*

[0692] вирусный белок SARS может быть модифицирован для облегчения бактериального процесса рекомбинантное выражение. В частности, спайковый белок SARS может быть модифицированный для облегчения транспорта спайкового белка на поверхность кожи бактериальная клетка-хозяин.

[0693] заявители обнаружили, что существует сильная структурная гомология между спайковым белком вируса атипичной пневмонии и белком NadA из *Neisseria meningitidis*. Оба белка имеют N-концевую шаровидную "головку" домен (аминокислоты 24-87), промежуточная зона альфа-спирали с максимумом склонность к образованию спиральных структур (аминокислоты 88-350), а также C-концевой мембранный анкерный домен, образованный четырьмя амфипатическими трансмембранами бета-нити (аминокислоты 351-405 из NadA). Кроме того, лейциновая молния мотив присутствует внутри свернутый спиралью этап. Смотрите, рис. 19 изображающих структура протеина шипа SARS Comanducci et al., "NadA, A Novel Вакцинный кандидат *Neisseria meningitidis*", *J. Exp. Медицинский*. 195 (11): 1445-1454 (2002). Кроме того, лейциновая молния мотив нада присутствует внутри свернутого спиралью этапа. Протенин NadA также формирует максимум поверхностно-экспонированные олигомеры молекулярной массы (соответствующие трем или четыре мономера), прикрепленные к наружной мембране менингококка.

[0694] когда протеин NadA выражен в *E. coli*, полнометражное белок собирается в олигомеры, прикрепленные к наружной мембране *E. coli* кишечная палочка, подобно тому, как белок представлен в менингококке. То Белок NadA лишен предсказанного мембранного якорного домена, то секретируется в супернатант культуры. Этот секретируемый белок растворим и все еще организованный в trimers.

[0695] таким образом, изобретение включает синтез белка, содержащего аминокислотная последовательность спайкового белка вируса ОРВИ или его фрагмента и вторая аминокислотная последовательность бактериального белка адгезии или а фрагмент его. Предпочтительно, указанный адгезионный белок выбирают из группа, состоящая из NadA, YadA (энтеропатогенной иерсинии) и UspA2 (of *Moraxella catarrhalis*). Дополнительные NadA-подобные протеины включают сыворотку резистентный белок DsrA гемофильной палочки *ducreyi*, иммуноглобулин связывающие белки EibA, C, D и F *E. coli*, белок наружной мембраны 100 у *Actinomyces comitans* ген saa носил на себе плазмида высокой вирулентности, присутствующая в сиговых токсигенных штаммах *E. coli* (STEC), и каждый из бактериальных белков адгезии, описанных в Великобритании. Патентная заявка № 0315022.4, поданная в июне. 26, 2003, каждый из которых специально включены здесь по ссылке.

[0696] предпочтительно указанный адгезионный белок содержит NadA или фрагмент из этого.

[0697] такие белки слияния могут быть использованы для облегчения рекомбинантного экспрессии иммуногенных участков поверхностных антигенов SARS, таких как шип. Эти конструкции сплавливания могут также позволить SARS S1 and / or S2 Домены подстраиваются под собственное подтверждение. Эти протеины сплавливания также способный олигомеризировать и образовывать димеры или тримеры, что позволяет S1 и / или S2 домены для связывания и адаптации конформаций, как в нативном спайке SARS белок. Кроме того, эти конструкции выражения облегчают поверхностное воздействие из спайкового белка ОРВИ.

[0698] термоядерные белки изобретения предпочтительно содержат лидер пептид от NadA любит протеин, предпочтительно NadA, полипептид от иммуногенная "головная" область спайкового белка, а также область стебля из либо нада, как белок, либо Спайк-белок. Во время выражения и обработка белка слияния, одна или несколько аминокислот могут быть расщеплены выкл или удаление, например, ведущего пептида или мембранного якоря домен.

[0699] области стебля способствуют олигомеризации экспрессии белок. Опционально, к термоядерным белкам изобретения дополнительно относятся Якорная область NadA, как белок. Эта анкерная область позволяет протеин сплавливания выражения для того чтобы поставить на якорь и собрать на бактериальной клетке Поверхность.

[0700] к термоядерным белкам изобретения относятся следующие соорудит:

[0701] (i) пептид руководителя нада (выборочно также включая первые 6 аминокислоты зрелого протеина NadA для того чтобы облегчить обрабатывать пептид руководителя и соответствующее созревание протеина) следовать к Домен Spike S1. Предпочтительно, эта конструкция содержит аминокислоты 1-29 из NadA (соответствует лидирующему пептиду NadA и первым 6 аминокислоты зрелого белка NadA, как показано на фиг. 22 и как изложено ниже) с последующим аминокислотами 14-662 белка шипа вируса ОРВИ (что соответствует домену S1, см. рис. 19 и SEQ ID NO: 6042 и as изложено ниже). В частности, конструкция (i) содержит SEQ ID NO: 7302.

[0702] (ii) пептид руководителя нада (выборочно также включая первое 6 аминокислот зрелого протеина NadA для того чтобы облегчить обрабатывать пептид руководителя и соответствующее созревание протеина) следовать к Домен шипа S1, за которым следуют Домены стебля и анкерной мембраны NadA. Предпочтительно, эта конструкция содержит аминокислоты 1-29 из NadA (соответствие к пептиду руководителя Нада и первым 6 аминокислотам зрелый белок NadA, как показано на фиг. 22 и как указано ниже:) затем следуют аминокислоты 14-662 белка шипа вируса ОРВИ (что соответствует домену S1, см. рис. 19 и SEQ ID NO: 6042 и as изложено ниже), а затем аминокислоты 88-405 из NadA (соответствующие стебель и анкерные мембранные Домены). В частности, построить (ii) содержит SEQ ID NO: 7303.

[0703] (iii) пептид руководителя нада (выборочно также включая первое 6 аминокислот зрелого белка NadA) с последующим всплеском вируса ОРВИ Домен S1, за которым следует домен nada stalk. Желательно, чтобы это конструкция-содержит аминокислоты 1-29 из NadA, за которыми следуют аминокислоты 14-662 спайкового белка вируса ОРВИ (соответствует домену S1), затем следуют аминокислоты 88-350 из NadA (соответствующие стеблю домен). В частности, конструкция (iii) содержит SEQ ID NO: 7304.

[0704] (iv) пептид руководителя нада (выборочно также включая первое 6 аминокислот зрелого белка NadA), а затем всплеск вируса ОРВИ Домен S1 и S2 (за исключением предполагаемой трансмембранной области), а затем по якорному домену нада. Предпочтительно, эта конструкция содержит аминокислоты 1-29 из NadA, а затем аминокислоты 14-1195 из Спайка вируса торс белок (соответствующий S1 и S2, исключая предполагаемую трансмембрану регион), за которым следуют аминокислоты 351-405 из NadA (соответствующие Nada anchor domain). В частности, конструкция (iv) содержит SEQ ID NO: 7305. Кроме того, якорный домен NadA может содержать аминокислоты 332-405 из NadA.

[0705] (v) пептид руководителя нада (выборочно также включая первые 6 аминокислоты зрелого белка NadA), а затем всплеск вируса ОРВИ Домен S1 и S2 (исключая предполагаемую трансмембранную область). Предпочтительно, чтобы эта конструкция содержала аминокислоты 1-29 NadA, а затем аминокислотами 14-1195 белка шипа вируса ОРВИ. Конкретно, конструкция (v) содержит SEQ ID NO: 7306.

[0706] в каждой из конструкций (i) - (v) первые 23 аминокислоты являются Пептид лидера нада, и дипептид ГС на выпарках 679-680 возникает от введение рестрикционного ферментативного сайта.

[0707] в конструкциях (i), (ii) и (iii) нада "голова" заменяется на домен шипа S1, и протеины сплавливания поставлены на якорь к наружной мембране *E. coli* или секретируется в супернатант культуры, соответственно. В конструктах (iv) и (v) Домены "голова" и "стебель" NadA являются заменены доменами шипов S1 и S2; также в этом случае два слияния протеины прикреплены к наружной мембране *E. coli* или сделаны секретным в культура супернатанта, соответственно.

[0708] соответственно, изобретение дополнительно включает белок слияния содержащая аминокислотную последовательность спайкового белка вируса ОРВИ или а его фрагмент и вторая аминокислотная последовательность бактериальной адгезии белок или его фрагмент. Предпочтительно,

аминокислоты, соответствующие "головку" адгезионного белка заменяют аминокислоты соответствующим вирусному Спайку S1 домена SARS. Альтернативно, аминокислоты, соответствующие доменам "голова" и "стебель" бактерии адгезионные белки заменяются аминокислотами, соответствующими атипичной пневмонии Домены вирусного спайкового белка S1 и S2.

[0709] как описано выше и показано на фиг. 19, домен S1 из Спайковый белок идентифицируется как глобулярное рецепторное связывание "голова" регион. Домен S1 спайкового белка предпочтительно содержит около аминокислоты 14-662 из SEQ ID NO: 6042. Домен S1 может содержать а более короткая последовательность аминокислот, где аминокислоты извлекаются из любого области N-терминала или C-терминала. Предпочтительно, 3, 5, 7, 9, 13, 15, 20 или 25 аминокислот извлекаются от или N-терминала или к-терминала регионы. Домен S1 дополнительно включает аминокислотные последовательности, имеющие идентификатор последовательности для области S1 SEQ ID NO: 6042. Вот вам пример: Домен S1-SEQ ID NO: 7307:

[0710] как описано выше и показано на фиг. 19, домен S2 из Спайковый белок идентифицируется как область "стебель". Область "стебель" содержит области домена олигомеризации, домен молнии лейцина регионы, мембранные анкерные области, гидрофобные доменные области, цистеин-богатая доменная область и цитоплазматическая хвостовая область. Домен S2 из спайкового белка предпочтительно исключается трансмембранная область и содержит около аминокислот 663-1195 из SEQ ID NO: 6042. Домен S2 может содержать более короткую аминокислотную последовательность, в которой аминокислоты являются удалены из областей N-терминала или C-терминала. Желательно, 3, 5, 7, 9, 13, 15, 20 или 25 аминокислот извлекаются от любого N-терминальные или C-терминальные области. Домен S2 дополнительно включает в себя аминокислотные последовательности, имеющие идентичность последовательности к области S2 SEQ ID NO: 6042. Пример домена S1 (с трансмембранной областью исключено) является SEQ ID NO: 7308.

[0711] примером белка NadA, описанного выше, является SEQ ID NO: 7309. Как обсуждалось выше, лидер последовательности NadA используется в слиянии белок предпочтительно содержит около первых 29 аминокислот NadA (включая последовательность лидера с около 6 аминокислотами головы NadA белок). Примеры таких последовательностей лидеров приведены в виде SEQ ID NOS: 7310 и 7311 ниже. Белок слияния может использовать последовательность лидера содержащая более короткую аминокислотную последовательность, в которой аминокислоты удаляются либо из N-терминальной, либо из C-терминальной областей. Предпочтительно, 1, 2, 3, 4, или 5 аминокислот извлекаются от или конца N-терминала или к-терминала из этой последовательности. Ведущая последовательность, используемая в белке слияния, может также включить аминокислотные последовательности, имеющие идентичность последовательности SEQ ID нет: 7310 или SEQ ID NO: 7311. Предпочтительно, чтобы последовательность лидеров содержала SEQ ID Нет: 7311.

[0712] выборочно, пептид сплавливания состоит из около первых 6 аминокислоты зрелого белка NadA для облегчения обработки лидера пептид и соответствующее созревание белка. Вот вам пример: первые 6 аминокислот зрелых белков NadA-это SEQ ID NO: 7312.

[0713] как обсуждалось выше, последовательности стебля и якоря NadA, используемые в белок слияния предпочтительно содержит около аминокислот 88-405 из NadA. Пример аминокислотной последовательности, содержащей nada стебель и якорь регионы указаны ниже как SEQ ID NO: 7313 ниже. Пример из Ан аминокислотная последовательность, содержащая область стебля NadA (без якоря регион) указан как SEQ ID NO: 7314 ниже. Пример одного аминокислотная последовательность, содержащая якорную область NadA, задается как SEQ ID NO: Пункт 7315 ниже. Белок слияния может использовать последовательность стебля (и/или якоря) содержащая более короткую аминокислотную последовательность, в которой аминокислоты удаляются либо из N-терминальной, либо из C-терминальной областей. Предпочтительно, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или 9 аминокислот извлекаются от или N-стержня или C-конечный конец последовательности. Лидирующая последовательность, используемая в слиянии белок может также включать аминокислотные последовательности, имеющие идентичность последовательности к SEQ ID NO: 7313.

[0714] термоядерные белки изобретения, в том числе описанные выше может быть подготовлено, например, следующее. Отдельные фрагменты (например как регионы описанные выше) могут быть усилены ПКР используя олигонуклеотидные праймеры приведены в таблице ниже. (S1.SUB.L относится к протеин шипа сплавленный к пептиду руководителя нада; C2 ссылается на область стебля спайкового белка, C и без стоп-кодона). То олигонуклеотиды были разработаны на основе последовательности ДНК NadA из штамма N. meningitidis B 2996 и шиповника из изолята вируса ОРВИ ФРА1. Каждый олигонуклеотид включает в себя сайт рестрикции в качестве хвоста для того, чтобы чтобы направить клонирование в вектор выражения pET21b. ТАБЛИЦА-США-00044 SEQ ID NO: сайт с ограничениями S1.SUB.L Для 7316 NdeI S1.SUB.L Rev 7317 BamHI S2 Для 7318 BamHI S2 Rev 7319 HindIII S2-stop Rev 7320 XhoI NadA.SUB.88 Для 7321 BamHI NadA.SUB.350 Rev 7322 XhoI NadA.SUB.332 Для 7323 HindIII NadA.SUB.405 Rev 7324 XhoI

[0715] отдельные фрагменты последовательно клонируются в вектор pET21b, для экспрессии белков под контролем индуцибельного T7 промотор. Домен S1 спайкового белка сливается с ведущим пептидом из NadA (S1.SUB.L) был получен методом ПЦР с использованием праймеров S1.SUB.L-за и S1.SUB.L-Rev передний олигонуклеотидный праймер содержит NdeI последовательность ограничения и кодирование последовательности для лидирующего пептида Нада плюс первые 6 аминокислот зрелого белка. Фрагмент ПЦР был клонирован как фрагмент NdeI / BamHI в векторе pET21b, открытым с помощью те же самые ферменты рестрикции. Этот клон (PET-S1.SUB.L) после этого было использовано к последовательно клонируйте другие различные домены, как BamHI/XhoI, BamHI/HindIII или hindiii / xhoi фрагменты. Ограничение BamHI и HindIII сайты вводят аминокислоты GS и KL соответственно.

[0716] протокол амплификации ПЦР был следующим: 200 нг генома ДНК из Neisseria meningitidis 2996 или 10 нг плазмидного препарата ДНК (плазмида pCMVnew, содержащая весь ген, кодирующий Спаик протеин), были использованы как шаблон в присутствии к 40. м. м каждого олигонуклеотидный праймер, 400-800. м. М раствор dNTPs, 1.раз. Буфер для ПЦР (включая 1.5 mM MgCl.SUB.2), 2,5 блока TAQI полимеразы ДНК (используя Perkin-Elmer AmpliTaq или Invitrogen Platinum Pfx ДНК-полимераза).

[0717] после предварительной 3-минутной инкубации всей смеси при 95.степень. С., каждый образец прошел двухступенчатую амплификацию: первое 5 циклов были выполнены с использованием температуры гибридизации, которая исключала хвост фермента рестрикции праймера (Tm1). За этим последовало 30 циклы в соответствии с температурой гибридизации, рассчитанной для вся длина oligos (Tm2). Времена удлинения, выполненные на 68.степень. С. или 72.степень. С., измененный согласно длине части, котор нужно быть усиленный. Циклы были завершены с шагом выдвигения 10 минут на 68.степень. С. или 72.степень. С.

[0718] амплифицированная ДНК либо загружалась непосредственно в агарозный гель и был очищен фрагмент ДНК, соответствующий полосе правильного размера из геля с помощью Qiagen.TM. набор извлечения геля, следуя за протокол производителя.

[0719] очищенная ДНК, соответствующая амплифицированному фрагменту, и плазмидные векторы переваривались с помощью соответствующих ферментов рестрикции, очищенный используя QIAquick.TM. набор очищения PCR (следуя за инструкции изготовителя) и были выполнены реакции лигирования.

[0720] продукты лигирования были преобразованы в компетентную E. coli DH5.альфа. а скрининг на рекомбинантные клоны проводили путем выращивания случайно подобранные колонии и извлечение плазмидной ДНК с использованием QIAGEN QIAprep Spin Miniprep Kit, следуя указаниям производителя Инструкции.

[0721] рекомбинантные плазмиды были введены в используемую E. coli BL21 (DE3 как хозяин выражения. Одиночные рекомбинантные колонии были привиты в LB+ ампициллин и инкубировали в 37 лет.степень. С. Для 14-16 Н. бактерии были непосредственно извлеченный центрифугированием (неиндуцированные условия) или разбавленный внутри свежая среда и выращивается в 37 лет.степень. С. до OD.SUB.600 между 0,4-0,8. Экспрессия белка была индуцирована добавлением 1 мм Изопропил-1-Тио-бета.-D-галактопиранозид (ИПТГ) в течение трех часов (индуцированные условия).

[0722] целые клеточные лизаты были получены ресуспендирующими бактериями в SDS-буфер выборки 1.раз. и кипятить в течение 5-10 мин. Равное количество белки отделяли с помощью системы NuPAGE (Invitrogen) или Biorad Gel, в соответствии с инструкциями производителя. Белки были выявлены с помощью Coomassie-голубое окрашивание или перенос на нитроцеллюлозные мембраны для анализ западных пятен. Вестерн-Блот был выполнен с использованием кролика поликлональная антисыворотка против очищенного нада.SUB.ДЕЛЬТА.351-405 (разбавленный 1: 3000) и вторичное пероксидазно-конъюгированное антитело (ДАКО).

[0723] результаты экспрессии в *E. coli* S1.SUB.L, S1.SUB.Л-Нада и S1.SUB.Л-Надь.SUB..ДЕЛЬТА.якоря показаны на фиг. 38 и 39. Схемы конструкций термодерного синтеза приведены на фиг. 37.

[0724] бактериальная экспрессия вирусных антигенов SARS также может быть использована для получения композиций, содержащих наружные мембранные везикулы, в которых они расположены везикулы наружной мембраны содержат один или несколько вирусных антигенов SARS.

[0725] везикулы наружной мембраны ("OMV"), также названные blebs, ссылаются к везикулам, образованным или полученным из фрагментов наружной мембраны а Грамотрицательная бактерия. Омвс обычно содержат белки наружной мембраны (ОМПС), липиды, фосфолипиды, периплазматический материал и липополисахарид (ЛПС). Грамотрицательные бактерии часто линяют OMVs во время вирулентные инфекции в процессе, известном как blebbing. OMVs также может быть полученный из грамотрицательных бактерий с помощью ряда химических веществ процессы денатурации, такие как извлечение моющего средства. Синтетические Омвс или липосомы, содержащие липидный бислой и обычно включающие водный слой сердечник, можно также подготовить с антигенами SARS вирусными вымысла.

[0726] Омвс изобретения предпочтительно представляют собой липидные везикулы, содержащие липидный бислой, окружающий водное ядро. Обычно это липидные пузырьки имеют одноядерную структуру (т. е. один липидный бислой окружает водное ядро), хотя мультиламеллярные липидные везикулы могут также использоваться в составы по изобретению. Омвс обычно имеют размеры в наномолярный-микромольный диапазон, например, от 1 нм до 100. μm . М, больше обычно от 10 нм до 10 μm .М и предпочтительно от 30 нм до 1 μm .М.

[0727] Омвс изобретения предпочтительно получают из грамм отрицательные бактерии. Грамотрицательные бактерии - это те бактерии, которые не могут сопротивляться обесцвечиванию в широко известном методе окрашивания грамм. Грамм отрицательные бактерии характеризуются сложной многослойной клеточной стенкой и часто обладают наружным слоем полисахаридной капсулы. Грамотрицательный бактерии, пригодные для производства Омвс, включают, например, виды из *Neisseria*, *Moraxella*, *Kingella*, *Acinetobacter*, *Brucella*, *Bordetella*, Хламидии, Порфириомоны, Актинобациллы, Борелии, Септрации, *Campylobacter*, *Helicobacter*, *Haemophilus*, *Escherichia*, *Legionella*, Сальмонелла, псевдомонас и Иерсиния.

[0728] Омвс изобретения предпочтительно содержат одно или более торс вирусные антигены или их фрагмент. Вирусные антигены SARS могут быть рекомбинантно выраженный в грамотрицательной бактериальной клетке хозяина и после этого урожай собирают с помощью OMB.

[0729] антигенные компоненты, такие как рекомбинантно выраженный вирус ОРВИ антигены, могут быть расположены в любом или всех трех основных отсеках липидные пузырьки, в том числе прикрепленные либо к внутренней, либо к наружной поверхности поверхность липидного пузырька, например через мембранный анкерный домен, или приложение к moiety липида; введенный в двухслойный липид, для пример, где антигенный компонент сам является гидрофобным или липидным основанный объект; или расположенный в водном центре или ядре липида пузырек.

[0730] синтетически подготовленные Омвс, или липосомы, могут быть использованы в изобретение. Такие липосомы могут содержать ряд различных липидов и жирные кислоты. Подходящие липиды для включения в липосомы изобретения включают, но не ограничиваются фосфатидилинозитол - (4,5) - дифосфат, фосфатидилсерин, фосфатидилхолин, фосфатидилэтаноламин, фосфатидиглицерин, холестерин, бета-олеил-гамма-пальмитоил, липополисахариды и галактоцерброзида.

[0731] подходящие средства для извлечения Омвс из бактериальных источников включите извлечение deoxycholate, извлечение Tris / HCl / EDTA, и литий извлечение ацетата. Предпочтительно, процесс извлечения включает а физические и / или химические средства для разрушения наружной бактериальной клетки мембрана для того чтобы выпустить достаточное Омвс для очищения и изоляция. См., например, WO 03/051379.

[0732] Омвс изобретения могут быть обогащены и / или дополнены: антигенные компоненты, такие как вирусные антигены SARS, методами, известными в искусство, включая, например, сразу комбинация *in vitro* где а напористый шаг комбинации можно выборочно приложить для того чтобы облегчить интеграция антигенного компонента в состав компартмента липосома. Способы энергетической комбинации, пригодные для использования в изобретение включает гомогенизацию, ультразвуковую обработку, экструзию и их комбинации.

[0733] предпочтительно, антигенный компонент, такой как вирус ОРВИ антиген, рекомбинантно произведенный клеткой хозяина от которой OMB полученный. В одном варианте осуществления такие Омвс получают путем введения нуклеиновых кислотная последовательность, кодирующая вирусный антиген SARS, в рекомбинантный препарат клетка-хозяин. Предпочтительно последовательность нуклеиновых кислот, кодирующая для SARS вирусный антиген контролируется сильной промоторной последовательностью. Предпочтительно, последовательность нуклеиновых кислот, кодирующая вирусный антиген SARS далее содержит сигнал пристрелки наружн-мембраны. Например, нуклеиновая кислотная последовательность, кодирующая вирусный антиген SARS, может быть слита в последовательность кодирование для природного белка наружной мембраны бактериальный хозяин. Предпочтительно, последовательность нуклеиновых кислот, кодирующая торс вирусный антиген сплавлен к последовательности пептида сигнала естественно встречающийся белок наружной мембраны бактериального хозяина.

[0734] методами получения оптимизирующего Омвс для применения в вакцинах являются: раскрыто в, например Filip et al., *J. Vact.* (1973) 115: 717-722; Дэвис и др., *J. Иммунол. Метод* (1990) 143:215-225; и WO 01/09350.

[0735] в одном варианте осуществления бактериальная клетка-хозяин, такая как *E. coli*, являются преобразовано для того чтобы выразить протеин шипа SARS. Как уже говорилось выше, протеин шипа может быть доработан для того чтобы облегчить бактериальное выражение и транспортировка спайкового белка на поверхность клетки-хозяина. Каждый из них конструкции слияния Spike/NadA, рассмотренные выше, могут быть использованы в OMV препараты по изобретению. Предпочтительно, конструкции, содержащие Спайк S1 шаровидный головной домен сплавленный к зоне черенка NadA использован для генерации Омвс. Конструкция может дополнительно включать лидера NadA пептид так же, как пептид анкера нада. Схематические представления этих предпочтительные конструкции OMV представлены на рис.2. 49.

[0736] в Примере 6 описан один из способов подготовки Омвс из изобретение.

b) экспрессия субъединицы вакцины против ОРВИ у млекопитающих

[0737] как обсуждалось выше, клетки хозяина млекопитающего могут быть использованы для рекомбинантная экспрессия белков вируса ОРВИ. Клетки-хозяева млекопитающих пригодными для использования в изобретении являются, например, китайский хомяк клетки яичника (CHO), клетки HeLa, клетки почки хомячка младенца (ВНК), обезьяна клетки почки (например, гепатит G2), клетки почки madin-Darby bovine ("MDBK"), как ну и другие тоже. Млекопитающие источники клеток включают, но не ограничены для человека или нечеловеческого примата (например, MRC-5 (ATCC CCL-171), WI-38 (ATCC CCL-75), эмбриональные клетки почек человека (293 клетки, обычно трансформированные по срезанной ДНК аденовируса типа 5), клетки VERO из почек обезьяны (включая, например клетки COS7), лошадь, корова (например, клетки MDBK), овцы, собаки (например, клетки MDCK из почек собаки, ATCC CCL34 MDCK (NBL2) или MDCK 33016, номер депозита DSM ACC 2219 как описано в WO 97/37001), кошка и грызун (например, клетки хомяка, такие как ВНК21-F, клетки НКСС, или Клетки яичника китайского хомяка (клетки Чо)), и могут быть получены от широкого разнообразие стадий развития, включая, например, взрослую, неонатальную, зародыш и эмбрион.

[0738] полинуклеотиды, кодирующие вирусные белки SARS, могут быть: модифицировано для облегчения или усиления экспрессии. Например, коммерческий лидер последовательности, известные в искусстве, такие как tPA или IgK или интерлейкин-2, может использоваться в рекомбинантных конструкциях. Предпочтительно, однако, чтобы используется естественная последовательность лидеров атипичной пневмонии. Использование естественной последовательности лидеров можно использовать для того чтобы обеспечить что протеин будет продан в человеческих клетках точно так же, как и при нормальной вирусной инфекции, которая может быть выгодно, например, для ДНК-вакцин, где антиген экспрессируется *in situ*.

[0739] как описано выше, последовательности теков можно использовать в выражении конструкции для облегчения очистки, обнаружения и стабильности

выраженный белок. Белки метки, пригодные для использования в изобретении, включают тег полиаргинина (Arg-tag), тег полигистидина (His-tag), флаг-тег, Strep-tag, с-мус-tag, S-tag, кальмодулин-связывающий пептид, целлюлозосвязывающий домен, SBP-tag, хитиновосвязывающий домен, глутатион S-трансфераза-tag (GST), мальтозсвязывающий белок, транскрипция терминальный анти-терминальный фактор (NusA), тиоредоксин E. coli (TrxA) и изомераза I дисульфида протеина (DsbA). Предпочитаемые протеины бирки включают Его-тэг и GST. Полная дискуссия по использованию tag белков может быть найдено в Terpe et al., "Обзор слияний белков тегов: от молекулярных и биохимические основы для коммерческих систем", *Аппл Микробиол Biotechnol* (2003) 60:523-533.

[0740] после очищения, протеины бирки могут выборочно извлекаться из экспрессированного белка слияния, т. е. с помощью специально подобранного ферментативные методы лечения известны в искусстве. Обычно используемые протеазы включают в себя энтерокиназа, вирус табачного травления (TEV), тромбин и фактор X. sub.есть

[0741] одна или несколько аминокислотных последовательностей или аминокислотных доменов спайковый белок может быть удален для облегчения рекомбинантного млекопитающего выражение. Например, весь домен S2 или трансмембрана Спайка регион может быть удален. Репрезентативные примеры некоторых выражений пригодны конструкции как полнометражного, так и усеченного спайкового гликопротеина для млекопитающих выражения приведены на фиг. 40. Полинуклеотидные последовательности представление каждой конструкции показано в SEQ ID nos 6578-6583. Один описание каждой аннотации показано ниже: ТАБЛИЦА-США-00045 Выражение Клона Конструкция Описания Имени NSH естественная последовательность лидера SEQ ID нет: 6578 полнометражный шип гистидиновая бирка HC естественная последовательность лидера SEQ ID нет: 6579 полнометражный шип nSh.DELTA.TC естественная последовательность лидера SEQ ID NO: 6580 Шип без трансмембранной последовательности гистидиновая бирка nS.DELTA.TC естественная последовательность лидера SEQ ID NO: 6581 Шип без трансмембранной последовательности ns1h естественная последовательность лидера SEQ ID нет: 6582 Домен S1 гистидиновая бирка ns1 естественная последовательность лидера SEQ ID нет: 6583 Домен S1

[0742] клонированные фрагменты кднк, включающие полноразмерное Спайковое кодирование последовательности, а также спайковая конструкция, удаленная из трансмембраны и были введены цитоплазматические Домены (TM-Cy-deleted Spike) для секреции в вектор выражения pCMV8 для создания nSh и nSh.DELTA.TC, соответственно. Оба спайковые белка были помечены остатками гистидина в конце C-terminus для помощи начальной характеристики выраженного спайковые белки. Аналогичные последовательности, кодирующие полноразмерный Спайк или трансмембранный и цитоплазматический домен удален Спайком, но без гистидиновые "метки" легко заменяются одним из навыков в этом искусстве.

[0743] вероятные местоположения выраженных пиковых конструкций были оценивают путем разделения экспрессированных белков на водную фракцию (АФ) и моющей фракции (DF) с использованием процедуры, показанной на фиг. 48, с результаты анализа western blot приведены на рис.1. 43. Вышеописанные векторные конструкции были оценены для экспрессии после трансфекции в Клетки COS7. Конструкция, выражающая белок Спайка полной длины осталось в мембране клетки пока конструкция выражающая усеченный спайковый белок располагалась либо в цитозоле (рис. 43) или секретируется в клеточную среду (рис. 44). Как показано на фиг. 43, полнометражный протеин шипа найден в DF (мембране) в агрегированной форме, пока усеченный белок содержится в АФ (цитозоле) в виде мономера. Как показано на фиг. 44, удаленные белки (Sh.DELTA.TC) секретируются, причем небольшая их часть полноразмерный спайковый белок обнаруживается в среде кроличьей сывороткой.

[0744] Рекомбинантно выраженные спайковые белки могут быть олигомеризованы. Когда спайковые белки должны использоваться в вакцине или для получения антител специфичные для спайкового белка, они предпочтительно олигомеризуются. В порядке для того чтобы получить олигомеризованный протеин шипа, предпочтительно поддерживать трансмембранный домен в конструкции рекомбинантного выражения. Для например, рис. 41 иллюстрирует западное пятно лизатов клеток COS7 сравнение выраженных НШ и nSh.DELTA.TC используя и анти -- его бирку и кроличьи антитела против ОРВИ. Как показано полнометражные (nSh) агрегаты, но усеченный (nSh.DELTA.TC) спайковый белок - нет. Антитела подняты против него-Меченый белок распознает полнометражный и усеченный шип белки в нативной и восстановленной формах. Антисыворотка кролика распознает Спайк белок только в невозстанавливающих условиях. Спайковые агрегаты или олигомеры присутствовали в большем количестве в клетке лизаты из выраженного nSh соорудит. Предпочтительно, олигомеризованные спайковые белки образуют а гомотример, как показано на фиг. 47

[0745] еще один эксперимент, проиллюстрированный на фиг. 42, демонстрирует, что олигомеризация выраженных NSH-конструкций, вероятно, связана с нековалентная связь (и, вероятно, не из-за, например, дисульфида связь). Олигомер диссоциирует на мономеры при повышенной температуре (80-100.степень. С.), Но стабилизировано в условиях уменьшения если не нагрето.

[0746] более добавочно предпочтено что рекомбинантно выраженный Спайк белки подвергаются гликозилированию. Туникамицин и гликозидазы были использованы к оцените гликозилирование. ИНЖИР. 45 иллюстрирует, что гликозилирование выражено на спайковые белки удаление трансмембранного домена не влияет регион. Как полнометражные (Sh), так и усеченные (Sh.DELTA.TC) Спайк торс белки гликозилируются.

[0747] предпочтительно, выражение конструкций изобретения не является токсичен для клеток-хозяев млекопитающих. ИНЖИР. 46 демонстрирует, что выражение иллюстрированные спайковые конструкции не токсичны для клетки-хозяина COS7.

[0748] способы трансфекции, экспрессии, культивирования, выделения и очищающие рекомбинантные белки из культур клеток млекопитающих известны в искусство. Например, спайковые конструкции SARS изобретения могут быть экспрессируется в 293 клетках. Эти клетки могут быть культивированы и трансфицированы внутри статические или монослойные культуры. Для быстрого крупносерийного производства торс белковые антигены в достаточных количествах для in vitro и in vivo оценка, включая исследования иммуногенности, крупномасштабных переходных процессов трансфекция 293 (эмбриональная почка человека) клеток может быть использована для получения миллиграмм количества рекомбинантного антигена(ов). Как вариант, больше масштабная трансфекция этих клеток может быть выполнена с 293 клетками внутри суспензионная культура. Предпочтительно, чтобы экспрессированные белки SARS были собраны от трансфицированных клеток между 48 и 72 часами после трансфекции или даже от 72 до 96 и более часов после трансфекции.

[0749] где клетки хозяина трансфицируются с усеченным шипом экспрессионные конструкции, выраженный спайковый белок секретируется из клетки хозяина и собранные от средств массовой информации клетки. После концентрации, то спайковый белок может быть очищен из среды с использованием, например, ГНА лектин с последующим ДЕАЕ и керамической гидроксиапатитовой колоночной хроматографией.

[0750] где клетки хозяина будут перенесены с полнометражным шипом выражение конструирует, а точнее удерживается внутри ячеек, и может очистьте от клеток triton X-100 извлеченных тензидом. Во всю длину Протеин шипа можно после этого захватить на лектине ГНА, следовать мимо хроматография гидроксиапатита и SP.

[0751] яичник китайского хомяка (СНО) или другой эукариот (например, млекопитающее) клетки, стабильно экспрессирующие вирусные антигены атипичной пневмонии данного изобретения, могут также можно вывести (например, рис. 73). Предпочтительно, чтобы клетки были клетками СНО, и эти конструкции будут содержать один или несколько маркерных или селекционных генов в порядок выбора для желаемых ячеек СНО. В одном варианте осуществления, the конструкции содержат усилитель/промотор ЦМВ, ген резистентности к ампициллину, и сплавленный DHFR и ослабленный ген неомицина для целей отбора. Стабильные клеточные линии затем могут быть получены с помощью выбора неомицина система в ячейках Чок-1. Затем выбранные клоны можно секвенировать для проверки целостность вставки, и переходные трансфекции могут после этого быть выполнено с использованием транс-LT1 полиаминового трансфекционного реагента (PanVera Corp., Мэдисон, Wis.) для оценки уровня экспрессии, а также целостности экспрессированный белок методом ИФА и вестерн-Блот-анализа.

[0752] способы получения клеток СНО, стабильно экспрессирующих SARS вирусные антигены изобретения содержат этапы трансфекции и первичный скрининг с селективной средой. Дополнительно, эти шаги являются затем следует субклонирование для обеспечения чистоты клеточных линий. Клеточная культура супернатанты могут быть проанализированы с помощью захвата антигена ELISA для количественного определения уровни экспрессии на всех этапах отбора и усиления.

[0753] для полнометражных Спайковых экспрессионных конструкций, метанольные неподвижные клетки может быть экранирован для внутреннего выражения иммунофлуоресцентным окрашиванием используя кроличье антитело против ОРВИ. Последовательные измерения на участке: Этап t75-flask расширения можно использовать для того чтобы убедиться стабильности уровень экспрессии. Молекулярная масса и целостность выраженного протеины могут быть проверены страницей и под родной и уменьшая и условия денатурации с последующим иммунопробированием.

[0754] в одном варианте осуществления векторы pCMV3, выражающие Спайк SARS-CoV белки либо в полнометражной, либо в усеченной форме вводят внутрь Клетки CHO-K1 с использованием реагента Trans-LT-1. На первый день, 1.раз.10.отхлебывать.6 клетки покрыты гальваническим покрытием на 100 мм посуде в неселективной среде F12+10% фетальной Бычья сыворотка+4 мм глутамин. На второй день клетки подвергаются трансфекции с помощью ДНК: смесь ЛТ-1 и средства массовой информации после этого заменили с полными средствами массовой информации Ф12. Двадцать четыре-сорок восемь часов спустя, в зависимости от плотности клеток, каждая тарелка 100 мм разделена к 4-6 тарелкам 100 мм. Среда будет изменена на полные селективные среды, содержащие Генетицин (неомицин) в концентрации 500 .mu.g/ml. Вся бычья сыворотка используемая в этих процедурах от TSE-свободных источников то соответствует действующим стандартам FDA. Через двадцать четыре часа среда меняется для завершения селективной среды плюс 500 мкг / мл неомицина. С десяти до четырнадцати через несколько дней отдельные колонии отбирают и переносят в 96 колодцев пластины и культивировали в полной селективной среде, но без G418. Когда примерно 80% скважин являются приточными, круглосуточно супернатанты экранируются методом spike capture ELISA положительными клонами являются переведен на двадцать четыре скважинных плиты. Для начального выражения: полнометражный белок шипа, клетки метанола фиксированные будет экранирован мимо иммунофлуоресцентное окрашивание с использованием кроличье антитела против ОРВИ. После низкие экспрессирующие клеточные линии были устранены, и их меньше, чем 20-30 клеточных линий, захват ELISA и вестерны будут использоваться для определения уровень экспрессии после лизиса клеток. Часть каждой линии клетки будет быть гранулированным, взвешенным и лизированным в 1% Тритон лизисном буфере, содержащем мопы, NaCl и MgCl.SUB.2 при одинаковом соотношении массы клеток к лизисному буферу. После лизиса супернатант собирается и уровень экспрессии составляет определенный. Три-четыре клона, производящие самый высокий уровень Спайка белок в правильной структуре и конформации будет выращиваться внутри трехлитровые биореакторы для расширения и адаптации к низкой сыворотке крови условия культуры подвеса для масштаба-вверх.

[0755] анализ Elisa захвата антигена для протеина шипа SARS может быть выполняется так, как описано в ст. Краткое описание данного анализа следует. 96 колодезных плоскодонных плит (Corning, Corning, NY.) покрыты с 250 НГ на лунку очищенного иммуноглобулина, полученного из кроличьих сывороток они были иммунизированы инактивированным вирусом торс. Между шагами, то тарелки промывают в буфере, содержащем 16% NaCl и 1% Triton X100. 100 .mu. L образцов супернатанта или лизата (разбавленных в буфере, содержащем 100 мм NaPO.SUB.4, 0,1% казеин, 1 мм ЭДТА, 1% Тритон x100, 0,5 м NaCl и 0,01% тиомерсал, pH 7,5) добавляют и инкубируют в течение 2 часов при 37.степень. С. связанный антиген реагирует против объединенной сыворотки SARS+ve или высокоаффинное моноклональное антитело человека или мыши против ОРВИ спайковый белок (инкубация 1 час, 37.степень. С.) И обнаруженный используя соответствующие видоспецифичные пероксидазные конъюгированные вторые антитела (30 минутная инкубация при 37.степень. С.; TAGO, Burlingame, Calif.). Тарелка разрабатываются в течение 15 минут при комнатной температуре с использованием подложки TMB (Пирс, Рокфорд, Болен.) и реакция остановила использовать 4N фосфорное кислота. Пластины считываются при длине волны 450 Нм и концентрации количество белка в мл образца получается из стандартной кривой (OD против белка концентрация) на основе серийных разведений известной концентрации рекомбинантный спайковый белок.

[0756] иммунопробирующий анализ также может быть выполнен после стандартные методы, описанные в других разделах статьи. Краткое описание следует. 10-20. mu. l образца проанализировано на странице 4-20% SDS под не-уменьшение / денатурируя условия с слабым топлением. Гели бегут в течение 1,5-2,0 часов при постоянном напряжении 100 В. Тогда белки есть переносится на нитроцеллюлозные мембраны (Millipore, Bedford, Mass.) для 45 мин с использованием полусухой западной системы переноса (BioRad, Hercules, Калифорния.) следуя инструкциям производителя. Мембрана после этого прореагировал против поликлональной сыворотки кролика анти -- шипа, следовать анти-кроличий Ig, конъюгированный с Alexa 688 (молекулярные зонды, Орегон). То кляксы сканируются с помощью инфракрасной системы визуализации (LI-Cor, Inc., Линкольн, Небр.).

[0757] самые высокие экспрессирующие линии клеток-кандидатов могут быть экранированы для экспрессия и стабильность спайкового белка в малом масштабе (3 литра) суспензионная культура. Клон-кандидат может быть дополнительно оценен для уровень экспрессии, а также целостность экспрессируемого белка после амплификация, и затем испытанный для стабильности выражения в отсутствие отбора. Выбранные клоны также могут быть протестированы на наличие поддержание целостности последовательности ДНК интегрированного Спайка атипичной пневмонии ген белка. Чтобы быстро контролировать уровень экспрессии в небольшой колбе (T25 или T75) и в трехлитровых культурах оценки, основанных на лектине процесс (лектин Gluconan Nivalis) может быть использован для выделения Спайка SARS белок до такой степени чистоты, что позволяет полуколичественно и характеристика белка в супернатанте CHO. Для полнометражного шипа белок, он будет получен от клеток Тритона X-100 извлеченных тензидом. Полнометражный спайковый белок будет затем захвачен на лектине ГНА, а затем с помощью гидроксиапатита и SP хроматографа. Элюированный белок после этого охарактеризовано мимо: 1) электрофорез геля полиакриламида (страница) и Окраска кумассие, 2) Иммунопробирование с анти-SARS кроличьими сыворотками, 3) структурная характеристика используя хроматографию исключения размера (SEC), как а также масс-спектрометрический анализ с использованием MALDI-TOF.

[0758] пути и методы иммунизации населения вакцинами против гриппа и ОРВИ изобретение более подробно обсуждается в разделе ниже. Примеры 7 - 9 проиллюстрировать образцы протоколов иммунизации для рекомбинантного Спайка белковая пища.

Тестирование Вакцины

[0759] до введения человеку, это нормально, чтобы проверить вакцины в модели на животных. Известна мышьяная модель коронавирусной инфекции SARS (Subbarao et al. (2004) J Virol 78:3572-77), а также других животных, которые могут быть использованы в качестве моделей инфекции и / или заболевания включают хорьков и обезьяны. Таким образом, изобретение обеспечивает нечеловеческое животное, которое заражено по коронавирусу атипичной пневмонии, где животное является предпочтительно хорьком или а примат (например, обезьяна или макака). Животное может быть гнотобиотиком. То животное предпочтительно не является кошкой (*Felis domesticus*). Животное может или не может не показывать симптомы ОРВИ, например, хорьков (*Mustela furo*) шоу заметная легочная патология после заражения. Смотрите: Martina et al. (2003) Природа 425: 915.

Е. полинуклеотиды, кодирующие антигены SARS изобретения

[0760] изобретение включает полинуклеотиды, кодирующие атипичную пневмонию антигены данного изобретения. Кроме того, изобретение включает в себя полинуклеотиды, оптимизированные для рекомбинантного производства (например, кодонная оптимизация) антигенов SARS изобретения, включая полинуклеотиды, кодирующие для каждой из конструкций слияния SARS рассмотренный выше.

Ф. вирусный вектор или вирусная поставка частицы антигенов SARS Изобретение

[0761] антигены изобретения могут экспрессироваться *in vivo* или *in vitro* полинуклеотидами, кодирующими антигены. Самовыражение и вручение документов полинуклеотиды изобретения могут быть облегчены с помощью вирусных векторов и / или вирусные частицы.

[0762] системы доставки на основе генов, полученные из вирусов, таких как альфавирусы, полезны для *ex vivo* и *in vivo* администрации гетерологичные гены, в том числе один или несколько генов SARS, имеющие терапевтическое действие или профилактическое применение. Эти системы можно также использовать для получения рекомбинантных белков, полученных из вируса ОРВИ в России культивируемые клетки. Системы доставки на основе генов изобретения включают в себя: вирусные векторы (например, вектор аденовируса, вектор поксвируса, альфавирус вектор) и невирусные векторы нуклеиновых кислот (например, ДНК, РНК), кодирующие один из них или больше антигенов вируса атипичной пневмонии. Полинуклеотиды, кодирующие вирус SARS антиген(ы) включаются в вакцины на основе генов индивидуально или в комбинации (например, как бицистронные конструкции).

1. Альфавирус

[0763] Альфа-вирусы являются членами семейства *Togaviridae* и имеют общие черты структурные и реплицирующие свойства. Синдбис вирус (грех) является то прототип вируса для молекулярного изучения других альфа-вирусов, а также вместе с вирусом венецуэльского Конского энцефалита (VEE) и Семлики Вирус пущи (SFV), наиболее широко используемые альфа-вирусы быть развиваются в экспрессионные векторы для гетерологичных генов (Шлезингер и Дубенский (1999) *Curr Opin. Биотехнол.* 10:434-439; Schlesinger (2001) *Эксперт ОПИН. БИОЛЬ. Ther.* 1:177-91).

[0764] Альфа-вирусы обладают относительно небольшим одноцепочечным геномом РНК положительной полярности, которая составляет приблизительно 12 КБ в длину, покрытый и полиаденилированные. РНК взаимодействует с мономерами вирусных капсидных белков, чтобы образуются нуклеокапсиды, которые в свою очередь окружены клеточной-хозяином-производным липидная оболочка, из которой выступают два вирусных гликопротеина, E1 и E2 формирование "спайковых" тримеров гетеродимерных субъединиц. Два открытых чтения фреймы 9 (ORFs) кодируют как полипротеины ферментативные неструктурные белки репликазы (5' ORF) и структурные белки вириона (3' ORF). Структурный полипротеин переведен от сильно обильного субгеномная мРНК, которая транскрибируется от сильного внутреннего альфа-вируса промотор (Strauss and Strauss (1994) *Microbiol. Откр.* 58: 491-562). Репликация генома происходит исключительно внутри клетки-хозяина цитоплазма как РНК.

[0765] наиболее распространенные векторы экспрессии альфа-вируса использовали оба позитивно-скрученная природа и модульная организация генома РНК. Эти векторы, названные "репликонами" из-за их свойства самоусиление, позволяющее вставлять гетерологичные последовательности на место структурных полипротеиновых генов, сохраняя при этом 5'- и 3'-конец сигналы репликация цис, неструктурные гены репликазы, и промотор области субгеномного перехода (Xiong et al. (1989) *наука* 243: 1188-1191; Liljestrom (1991) *Bio/Technology* 9:1356-1361). Химерный альфа-вирусные векторы (и частицы) из последовательностей, полученных из дивергентных описаны также семейства вирусов. (см., например, патент США применение Ser. No. 09/236, 140; см. Также патент США. № 5,789,245, 5,842,723, 5,789,245, 5,842,723 и 6,015,694; а также WO 95/07994, WO 97/38087 и WO 99/18226). Совместное международное издание WO 02/099035, опубликовано Dec. 12, 2002 и включенный ссылкой в свое полностью здесь описаны химерные молекулы альфа-вируса и модифицированные молекулы альфа-вируса, имеющие модифицированные уровни биобезопасности.

[0766] отсутствие структурных белковых генов приводит к появлению альфа-вируса векторы репликации неполноценны, в этом амплификация РНК и высокий уровень гетерологичная экспрессия генов происходит внутри клетки-мишени, но межклеточное распространение вектора невозможно из-за невозможности формирования потомство вирионов. На протяжении многих лет, несколько синонимичных терминов имеют появились те, что используются для описания частиц альфа-вирусного репликона. Эти термины включают рекомбинантную вирусную частицу, рекомбинантный альфа-вирус частица, частица реплик альфа-вируса и частица репликона. Тем не менее, как используемые здесь, все эти термины относятся к вирионоподобному блоку, содержащему векторная репликация РНК, производная от альфа-вируса. Кроме того, эти условия могут быть совместно именуется векторами, векторными конструкциями или доставкой генов векторные иллюстрации.

[0767] упаковка РНК-репликона в частицы может быть выполнена путем введение РНК-репликона в перmissive клетки (например, РНК или ДНК трансфекция, или заражение частицами), которые также содержат один или несколько структурные белковые экспрессионные кассеты или конструкции "дефектного хелпера" кодирование структурных белков альфа-вируса. Эти структурные белки кодирующие конструкции сами могут быть введены в ячейки с помощью трансфекция либо РНК, либо ДНК, и чаще всего сохраняют нативную форму субгеномный промотор альфа-вируса, а также 5'- и 3' -концевые сигналы cis для ко-амплификация с репликоном, но лишены каких-либо репликазных генов и сигнал упаковки РНК (Liljestrom (1991) *Bio / Technology* 9: 1356-1361; Пушко и др. (1997) *Вирусология* 239: 389-401; Polo et al. (1999) *PNAS* 96: 4598-4603). Постоянные линии клеток, которые являются стабильными трансформируются конструктами, экспрессирующими структурные белки альфа-вируса (например, упаковочные клеточные линии) позволяют избежать переходных процессов методы производства трансфекции (Polo et al. (1999) *PNAS* 96: 4598-4603).

[0768] настоящее изобретение включает в себя композиции и способы для производство дефектных вирусных векторных частиц репликации (например, частицы alphavirus replicon) для использования в ex vivo и in vivo применение гетерологичных генов, кодирующих белки, имеющие терапевтическое действие или профилактическое применение, включая гены, кодирующие для одного или более Вирусные антигены ОРВИ.

[0769] в одном аспекте изобретение включает способ получения репликация дефектных вирусных векторных частиц (например, alphavirus replicon частицы), содержащие стадии введения по меньшей мере одной нуклеиновой кислоты молекула, содержащая вирусный вектор (например, РНК репликации альфа-вируса) в бессмертные клетки настоящего изобретения, при условиях, которые позволяют для комплементации вирусного вектора (например, РНК alphavirus replicon) и производство вирусных векторных частиц (например, alphavirus replicon частицы), и изолировать вирусные частицы вектора от клеток или супернатанты культуры клеток. В некоторых вариантах осуществления, увековеченные клетки выращиваются в суспензии, например PERC.6 ячеек. В других вариантах осуществления, методы выполняются в крупномасштабных объемах, например, литр объемы или больше, например, в роллерах, больших колбах, Фабрики клетки Nunc, кубики клетки Corning, сосуды заквашивания, etc).

[0770] в некоторых вариантах осуществления вирусный вектор является альфа-вирусным репликоном РНК, которая требует комплементации путем предоставления одного или нескольких альфа-вирусов структурные белки в транс, в пределах бессмертной клетки. В таком виде экземпляры, способы комплементации для получения alphavirus replicon частицы могут включать в себя введение одной или нескольких нуклеиновых кислот (например, РНК, ДНК), кодирующие указанный структурный белок (ы) альфа-вируса (например, капсид и / или огибающие гликопротеины) в бессмертные клетки, либо временно или стабильно, и либо одновременно с этим, либо до начала введения РНК alphavirus replicon. В некоторых вариантах осуществления, the РНК alphavirus replicon вводится в клетку путем трансфекции а в vitro-транскрибированная РНК. В других вариантах осуществления, РНК alphavirus replicon вводится в клетку путем трансфекции ДНК (например, Элвиса), которая способен транскрибировать внутри клетки РНК-репликон. Пока что ... другие варианты осуществления, РНК alphavirus replicon вводится в клетку путем заражения семенным материалом частиц альфа-вирусного репликона. В определенные варианты осуществления, нуклеиновые кислоты, кодирующие указанный альфа-вирус структурные протеины являются дефектными вспомогательными РНК или ДНК, которые могут транскрибируют внутри клетки дефектные вспомогательные РНК.

[0771] как описано здесь, "вектор репликации РНК альфа-вируса", "РНК replicon vector", "replicon vector" или "replicon" относится к РНК молекула, которая способна направлять свою собственную амплификацию или саморепликацию in vivo, в пределах клетки-мишени. Чтобы руководить своими собственными амплификация, молекула РНК должна кодировать полимеразу(ы), необходимую катализировать амплификацию РНК (например, неструктурные белки альфа-вируса nsP1, nsP2, nsP3, nsP4) и также содержат последовательности РНК цис требуемые для репликация, которые распознаются и используются закодированными полимеразы (ы). Репликон векторной РНК альфа-вируса должен содержать следующие упорядоченные элементы: 5' вирусные или клеточные последовательности, необходимые для неструктурная протеин-опосредованная амплификация (сможете также быть названо как 5' CSE, или 5' CIS последовательность репликации, или 5' вирусные последовательности, необходимые в cis для репликации, или 5' последовательность, которая способна инициировать транскрипция альфа-вируса), последовательности которых, будучи выраженными, кодируют для биологически активных неструктурных белков альфа-вируса (например, nsP1, nsP2, nsP3, nsP4) и 3' вирусные или клеточные последовательности, необходимые для неструктурная протеин-опосредованная амплификация (сможете также быть названо 3' CSE, или 3' вирусные последовательности, необходимые в cis для репликации, или последовательность распознавания РНК-полимеразы альфа-вируса). РНК альфа-вируса векторный репликон также должен содержать средство для выражения одного или нескольких гетерологичные последовательности, такие как, например, IRES или вирусная (например, альфа-вирусный) субгеномный промотор (например, промотор области соединения) который может, в некоторых вариантах осуществления, быть изменено с целью увеличения или уменьшения вирусная транскрипция субгеномного фрагмента, или для уменьшения гомологии с дефектными кассетами экспрессии хелперов или структурных белков, и один или более гетерологичные последовательности, которые должны быть выражены. Предпочтительно, чтобы гетерологичная последовательность(ы) содержит ген, кодирующий белок, который является 3' проксимальный ген в пределах векторного репликона. И желательнее реплик далее образуется полиаденилатный тракт.

[0772] как описано здесь, "рекомбинантная частица Альфа-вируса", "alphavirus replicon particle" и "replicon particle" относится к А вирионоподобный блок, содержащий репликон вектора РНК альфа-вируса. Обычно, рекомбинантная частица альфа-вируса содержит один или несколько альфа-вирусов структурные белки, липидная оболочка и РНК-векторный репликон. Предпочтительно, чтобы рекомбинантная частица альфа-вируса содержала нуклеокапсид структура, содержащаяся в клеточном липидном бислое хозяина, например, плазматическая мембрана, в которой находится одна или несколько альфа-вирусных оболочек гликопротеины (например, E2, E1) являются встроенными. Частица может также содержать другие компоненты (например, целевые элементы, такие как биотин, другие вирусные структурные белки или их части, гибридные оболочки или другое рецептор связывающие лиганды), которые направляют тропизм частицы от который и был выведен альфа-вирусом. Вообще взаимодействие между собой РНК

альфавируса и структурный белок(ы), необходимые для эффективного формирования а частица репликона или нуклеокапсид могут быть взаимодействием РНК-белка между капсидным белком и упаковочным сигналом или упаковочной последовательностью содержится в составе РНК.

[0773] "клеточная линия упаковки Альфавируса" относится к клетке, которая содержит одна или несколько кассет для экспрессии структурных белков альфавируса и которые производит рекомбинантные частицы альфавируса (частицы репликон) после введение репликона векторной РНК альфавируса, эукариотического слоя система инициации вектора, или рекомбинантная частица альфавируса. То родительская клетка может иметь млекопитающее или нематериальное происхождение. Внутри предпочитаемые варианты исполнения, упаковочная клеточная линия стабильно трансформируется с помощью структурная кассета(ы) выражения протеина.

[0774] "дефектная вспомогательная РНК" относится к молекуле РНК, которая способна амплификации и экспрессии одного или нескольких структурных альфавирусов белки внутри эукариотической клетки, когда эта клетка также содержит функциональные альфавирусные неструктурные белки" репликазы". Альфавирус неструктурные белки могут быть выражены внутри клетки с помощью альфавируса Вектор репликация РНК или другие средства. Разрешить усиление и структурная экспрессия белка, опосредованная неструктурным альфавирусом протеины, неполноценная молекула РНК хелпера должны содержать 5' - конец и 3' - концевые последовательности РНК, необходимые для амплификации, которые распознаются и используется неструктурными белками, а также средством для их экспрессии или больше структурных белков альфавируса. Таким образом, альфавирус дефектный вспомогательная РНК должна содержать следующие упорядоченные элементы: 5' вирусная или клеточные последовательности, необходимые для амплификации РНК альфавирусом неструктурные белки (также называемые в другом месте как 5' CSE, или 5' cis последовательность репликации, или 5' вирусные последовательности, необходимые в СНГ для репликация, или 5' последовательность, которая способна инициировать транскрипцию альфавируса), средство для выражения одного или нескольких структурных признаков альфавируса белки, последовательность(ы) генов, которая (которые) при экспрессии кодирует для одного или более структурные белки альфавируса (например, С, Е2, Е1), 3' вирусные или клеточные последовательности, необходимые для амплификации неструктурными белками альфавируса (также упоминается как 3' CSE, или 3' вирусные последовательности, необходимые в СНГ для репликация или последовательность распознавания Альфа-вирусной РНК-полимеразы), а также предпочтительно тракт полиадезилата. Как правило, дефектная вспомогательная РНК не следует само по себе кодировать или выражать в полном объеме все четыре альфавируса неструктурные белки (nsP1, nsP2, nsP3, nsP4), но могут кодировать или выражают подмножество этих белков или их частей, или содержат последовательность(ы), полученные из одного или нескольких неструктурных белковых генов, но которые по характеру своего включения в неполноценный помощник не имеют экспрессируют неструктурные белки или их части. Как средство для того чтобы экспресс-структурный белок(ы) альфавируса, дефектная вспомогательная РНК может содержат вирусный (например, альфавирусный) субгеномный промотор, который может, в некоторые варианты осуществления, были доработаны для того чтобы модулировать транскрипцию субгеномный фрагмент, или для уменьшения гомологии с РНК-репликоном, или в качестве альтернативы некоторые другие средства для осуществления экспрессии альфавируса структурный белок (например, внутренний участок входа рибосомы, рибосомный элемент readthrough). Предпочтительно ген структурного белка альфавируса является 3' проксимальный ген внутри дефектного помощника. Кроме того, он также является предпочтительно, чтобы дефектная вспомогательная РНК не содержала последовательностей, которые облегчение РНК-белковых взаимодействий со структурными белками альфавируса(s) и упаковывать в нуклеокапсиды, вирионоподобные частицы или альфавирус частицы-репликоны. Дефектная вспомогательная РНК является одним из конкретных воплощений кассета для экспрессии структурных белков альфавируса.

[0775] Альфавирус для использования в изобретении может быть выращен в любом из следующих компонентов: клеточные линии, рассмотренные выше, как подходящие для вируса торс.

[0776] частицы реплик Альфавируса могут быть произведены согласно настоящему изобретению путем использования вышеуказанных клеточных линий (например, бессмертной клетки линии) и разнообразие опубликованного и принятого вектора альфавируса методологии. Такие методологии включают, например, переходные процессы упаковочные подходы, такие как ко-трансфекция *in vitro* транскрибированных препаратов репликон и дефектные вспомогательные РНК (ы) (Liljestrom, Bio / Technology 9: 1356-1361, 1991; Bredenbeek et al., J. Virol. 67:6439-6446, 1993; Фролов и др., J. Virol. 71:2819-2829, 1997; Пушко и др., Вирусология 239: 389-401, 1997; U. S. Pat. № 5,789,245 и 5,842,723) или ко-трансфекция плазмидного репликона на основе ДНК и дефектного хелпера конструктор (ы) (Дубенский и др., J. Virol. 70: 508-519, 1996), а также введение кассет для экспрессии структурных белков альфавируса (например, Дефектный хелпер на основе ДНК) в бессмертные клеточные линии настоящего времени изобретение для создания стабильных упаковочных клеточных линий (ПКЛ) (Polo et al., PNAS 96: 4598-4603, 1999; U. S. Pat. № 5,789,245, 5,842,723, 6,015,694; WO 97/38087, WO 99/18226, WO 00/61772 и WO 00/39318). Стабильная упаковка клеточные линии могут затем быть использованы для alphavirus replicon particle производство. ПКЛ может быть перенесен с *in vitro* транскрибированным РНК alphavirus replicon, трансфицированная с помощью плазмидной ДНК-репликона (например, вектор Элвиса), или заражен семенным материалом альфавируса частицы репликона, а затем инкубировали в условиях и в течение некоторого времени достаточный для того чтобы произвести частицы реплик альфавируса потомства в культура супернатанта. В добавлении, частицы репликона потомства могут впоследствии пассировать в дополнительных культурах наивного ПКЛ путем инфекция, приводящая к дальнейшему расширению и коммерческим масштабам подготовка. Важно отметить, что при использовании дефектной вспомогательной РНК или стабильного РНК основанный на конфигурации структурного гена "разделения", эти репликон запасы частиц могут быть получены без обнаруженного загрязнения RCV.

[0777] после сбора урожая, супернатанты сырой культуры, содержащие химерные частицы alphavirus replicon могут быть уточнены путем проходить сбор урожая через фильтр (например, 0,2 мкм, 0,45 мкм, 0,65 мкм, 0,8 мкм поры размер). Выборочно, незрелые супернатанты могут подвергнуться к малой скорости центрифугирование перед фильтрацией для удаления крупных остатков клеток. Внутри один вариант осуществления, эндонуклеаза (например, Бензоназа, Sigma #E8263) добавляется к подготовке частиц репликона альфавируса перед или после а хроматографическая стадия очистки для переваривания экзогенной нуклеиновой кислоты. Кроме того, препарат можно концентрировать перед использованием очистки один из любых широко известных методов (например, тангенциальная фильтрация потока). Сырой или уточненные частицы репликон альфавируса могут быть сконцентрированы и очищенный хроматографическими методами (например, ионный обмен хроматография, хроматография исключения размера, гидрофобное взаимодействие хроматография, хроматография сродства), как те описанные внутри WO01 / 92552, включенный ссылкой в полном объеме здесь. Два или больше такие методы очистки могут выполняться последовательно.

Пример частиц Альфавирусного Реплика, кодирующих Спайк (Ы) вируса атипичной пневмонии) Антиген

[0778] изобретение включает композиции и способы получения дефектных вирусных векторных частиц репликации (например, альфавирус частицы replicon) для пользы в *ex vivo* и внутри-администрации *in vivo* гетерологичные гены, кодирующие белки, имеющие терапевтическое или профилактическое действие применение, в том числе гены, кодирующие один или несколько вирусных ОРВИ антигены.

[0779] в следующем примере показан способ получения альфавируса частицы репликона, кодирующие Спайк (ы) антигена вируса ОРВИ.

[0780] ген Спайка вируса торс может быть включен в альфавирус частицы replicon, полученные из различных альфавирусов, таких как Синдбис вирус, Семлики Лесной вирус (США Пат. No. 5,739,026), венесуэльская лошадь вирус энцефалита (США Пат. No. 6,531,135), и частица репликона химеры, полученные из более чем одного альфавируса (США Пат. No. 6,376,236, WO 02/99035). Кроме того, ген Спайка вируса атипичной пневмонии может быть включен в своей полноте (кодирующий полнометражный спайковый белок) или в модифицированном виде форма, включающая, например, удаление или усечение последовательности, например: что кодируемый белок Спайка имеет меньшую длину, чем полная длина (например, С-терминальное усечение одного или нескольких (например, по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30 и т.д.) аминокислоты, удаленные из трансмембраны область и цитоплазматический хвост).

[0781] например, ген Спайка может быть клонирован как полноразмерный ген в вектор VCR-chim2.1 (WO 02/99035) стандартными условиями RT-PCR или путем стандартного субклонирования от одной из других описанных плазмид при этом используются коммерчески доступные эндонуклеазы рестрикции. Для обратный шаг транскрипции в стандартном RT-PCR, верхний индекс комплект предварительного усиления (Invitrogen.TM.) и праймер SEQ ID NO: 7325 (sp-RT-R) используются:

[0782] для этапа амплификации, набор преимуществ полимеразы кдна (Clontech) и два праймера Sp-F-BbvCI (SEQ ID NO: 7326) и Sp-R-NotI (SEQ ID NO: 7327) используются:

[0783] передний праймер предназначен для хранения последовательности ссасс (Козак, 1991 JBC 19867-70) перед кодоном ATG для оптимизации эффективности трансляции спайкового гена. Также, передний праймер содержит место ограничения BbvCI и обратный праймер содержит Сайт рестрикции NotI для последующего клонирования амплифицированного ПЦР гена.

[0784] продукт ПЦР очищается с помощью удаления нуклеотида QIAquick набор (QIAGEN), переваренный с BbvCI и NotI, гель очищенный с QIAquick Набор для экстракции геля (QIAGEN) и лигатура к плазмиде VCR-Chim2. 1 предварительно переваривается теми же ферментами. Клоны, содержащие шит торс последовательность проверяется путем секвенирования, и новая конструкция называется VCR-Chim2. 1-SARSSpike.

[0785] чтобы генерировать частицы veerep / SINenv-SARSSpike replicon плазмиды VCR-Chim2. 1-SARSSpike, VCR-DH-Scap (WO 02/99035), и VCR-DH-Sglyd1160 (WO 02/99035) линеаризуются с помощью фермента рестрикции PmeI и используется для транскрипции in vitro, как описано ранее (Polo et al., 1999, PNAS 96: 4598-603; WO02/99035). Расшифровки есть co-transfected в клетки ВНК как ранее описано (Polo et al., 1999, там же.; WO02 / 99035). Трансфицированные клетки инкубируют в 34 года.степень. С., супернатанты собирали в течение 20 и 30 часов после электропорации, осветленный центрифугированием, и очищенный хроматографией как ранее описано (WO 01/92552).

[0786] экспрессия спайкового белка SARS из частицы репликона проверен путем заражать клетки ВНК всю ночь с очищенным VEerep / SINenv-SARSSpike или veerep / SINenv-GFP (WO 02/99035) replicon частицы. Кроме того, клетки ВНК также были трансфицированы параллельно с in vitro транскрибирована РНК VCR-Chim2. 1-SARSSpike replicon. В 16 часов постинфекционные и трансфекционные клетки лизированы и представляют собой образец лизат, анализируемый western blot с использованием антитела, распознающего атипичную пневмонию вирусный спайковый белок. Белки на геле окрашиваются или переносятся к мембране для анализа Western blot с сыворотками от выздоравливающих пациенты или альтернативно антисера мыши или кролика произведенная против вирус SARS. Вводятся частицы veerep / SINenv-SARSSpike replicon получателю вакцины (например, грызуну, нечеловеческому примату, человеку) в качестве описано в другом месте настоящего изобретения.

[0787] FIG. 67 показаны данные анализа western blot, выполненного в соответствии с не редуцирующие условия, использующие поликлональный вирус ОРВИ, специфичный для кроликов антисыворотка. Западные данные показывают, что не только атипичная пневмония является всплеском белок, экспрессируемый в клетках, инфицированных частицами альфавирусного репликона, или трансфицируется с РНК replicon, но преобладающей формой Спайка является то, что о гомотримере (рис. 67А). Аналогичная гомотримерная ассоциация шипа белок наблюдался в западных кляксах вирионов SARS очищенных от SARS вирус инфицировал супернатанты клеток VERO, и этот гомотример-тепло лабильны, о чем свидетельствует диссоциация на мономерные формы при 80.степень. С. и 100.степень. С. (Рис. 67В).

[0788] для дальнейшей характеристики экспрессии спайкового белка SARS и обработка следующего выражения из векторов alphavirus replicon, ВНК-21 клетки были заражены с частицами репликон альфавируса выражающая полнометражный шип. В 6 ч постинфекции с мои 5, инфицированных клетки мечили в течение 1 ч с помощью L - [отхлебывать.35S] метионин / цистеин и гоняли за указанное время. Этот [отхлебывать.35S] - Меченый спайковый белок был иммунопреципитируется анти-SARS кроличьей сывороткой и переваривается Эндо-Н. Как переваренные, так и непереваренные белки были проанализированы на 4% полиакриламид - страница SDS в условиях уменьшения. Как показано на фиг. 55, полнометражный спайковый белок синтезируется как Эндо-Н чувствительный максимум маннозный гликопротеин (gp170, форма ER), который подвергается модификации до Эндо-Н резистентный гликопротеин со сложными олигосахаридами (gp180, а Форма Гольджи). Происходит преобразование gp170 в форму gp180 в течение 2 часов.

[0789] частицы репликона Альфавируса, экспрессирующие один или несколько белков SARS (например, частицы veerep/SINenv-SARSSpike replicon) управляют к реципиент вакцины с целью индуцирования специфического иммунного ответа на торс (например, грызун, хорек, нечеловеческий примат, человек), как описано в другом месте в настоящем изобретении. Иммунизацию можно проводить с помощью различных маршрутов, в том числе, например, внутримышечных, подкожных, внутрикожно и интраназально. Кроме того, alphavirus replicon частицы могут использоваться отдельно или в комбинации (например, "prime-boost") с другие подходы к вакцинации настоящего изобретения, или альтернативно частицы репликона альфавируса могут ко-выразить антиген от другого респираторные патогены или быть совместно введенным в комбинации с частицы альфавирусного репликона, экспрессирующие антигены из других дыхательных путей патогенные микроорганизмы (например, вирус гриппа, вирус парагриппа, респираторные синцитиальный вирус, метапневмовирус человека). Например, индукция из антитела против спайкового белка у животных, иммунизированных им Частицы veerep / SINenv-SARSSpike replicon были продемонстрированы на мышах (рис. 68). Эти исследования на мышах также включали дополнительные группы вакцин для сравнение, в том числе инактивированного вируса ОРВИ и рекомбинантного усеченные спайковые белковые вакцины описывают в другом месте здесь, а также плазмидная ДНК, используемая в качестве Прайма, а затем частицы Альфа-вируса-репликона, как повышение. Данные ясно показывают очень мощные иммунные реакции для всех группы вакцин, в том числе группа частиц Альфа-вируса replicon. IT следует отметить, что уровень антител, индуцированных инактивированными Показано, что вакцина против вируса ОРВИ, используемая в этих экспериментах, является защита в модели проблемы животных вируса атипичной пневмонии.

[0790] аналогичным образом, гены, кодирующие другие антигены вируса SARS (например, белок нуклеокапсида, мембранный гликопротеин) клонируются в альфавирус векторы репликации, либо по отдельности, либо в комбинации, чтобы генерировать частицы альфавируса replicon согласно учениям настоящего времени изобретение и использование стандартных методов молекулярной биологии.

Пример плазмидной ДНК на основе Альфавируса, Экспрессирующей Спайк (Ы) вируса SARS)

[0791] изобретение включает получение плазмидной ДНК, экспрессирующей а Антиген вируса ОРВИ для профилактической или терапевтической иммунизации против Вирусная инфекция торс. В одном варианте осуществления вирусный антиген SARS представляет собой Спайк (ы) протеин. В одном варианте осуществления плазмидная ДНК является на основе альфавируса.

[0792] в следующем примере показан один из методов подготовки плазмидная ДНК на основе альфавируса, экспрессирующая Спайк (ы) вируса SARS.

[0793] ген Спайка SARS может быть доставлен с использованием любого из альфавирусов на основе плазмидные репликоны ДНК, такие как ПЗВ (Dubensky et al, 1996 J Virol. 70: 508-19), SINCP (WO 01/81609), или VCP (PCT WO 02/99035).

[0794] например, ген Спайка SARS клонирован в SINCP используя стандартные методы РТ-ПЦР. Oligo Sp-RT-R использовано для обратного шаг транскрипции с набором предварительной амплификации Superscript (Invitrogen). Для этапа амплификации преимущество кднк-полимеразы комплект (Clontech) с Sp-R-NotI и Sp-F-XhoI (SEQ ID NO: 7328) используются грунтовки.

[0795] праймер Sp-F-XhoI был конструирован для того чтобы содержать последовательность ссасс внутри фронт кодона ATG для оптимизации эффективности перевода (Kozak 1991, там же) спайкового гена. Кроме того, праймер содержит ограничение XhoI сайт для последующего клонирования амплифицированного ПЦР гена.

[0796] продукт ПЦР очищается с помощью удаления нуклеотида QIAquick набор, переваренный с XhoI и NotI, гель очищенный с QIAquick Gel Набор для экстракции и лигатура для плазмиды SINCP, предварительно переваренной тем же способом ферменты. Клоны, содержащие последовательность шипов SARS, проверяются с помощью секвенирование и новая конструкция называется SINCP-SARSSpike.

[0797] экспрессия спайкового гена атипичной пневмонии верифицируется транзиторным методом трансфекция клеток ВНК с 2. mu. g любой плазмидной ДНК SINCP-SARSSpike или SINCP предварительно инкубировали в течение 5 минут с 5. mu. l из Транзитный Полиаминовый реагент (Mitug) в низкой сывороточной среде Optitem (Life Технологии). Через 48 часов pos-трансфекции клетки лизировали и брали пробы лизат запускается на 8% SDS-странице. Белки на геле являются либо окрашивают или переносят на мембрану для анализа Western blot с помощью сывороток от выздоравливающих пациентов, или альтернативно с сыворотками от мыши или кролики.

[0798] SINCP-SARSSpike plasmid replicon вводят в вакцину реципиент (например, грызун, нечеловеческий примат, человек) как сформулированный или несформулированная плазмидная вакцина, одна или в комбинации (например, "Прайм-буст") с другими вакцинами настоящего изобретения, как описано в другом месте здесь.

[0799] аналогичным образом, гены, кодирующие другие антигены вируса SARS (например, белок нуклеокапсида, мембранный гликопротеин) клонируются в альфавирус плазмидные векторы репликации.

2. Векторы Экспрессии Плазмиды

Пример плазмидной ДНК, Экспрессирующей Спайк (Ы) вируса ОРВИ

[0800] в следующем примере показан способ получения плазмиды ДНК, экспрессирующая Спайк (ы) вируса SARS.

[0801] спайковый антиген вируса атипичной пневмонии также может быть доставлен с помощью других векторы экспрессии плазмидной ДНК (иногда называемые "обычными" ДНК-вакцины), основанные на промоторе полимеразы II, таком как, например, а Промотор ЦМВ. ДНК-вакцина гена спайкового антигена индуцирует антители реакция у мышей (Zhao et al. (2004) Acta Biochim et Biophysica Sinica 36: 37-41), и было найдены, что наводит вирусную нейтрализацию и защитный иммунитет у мышей (Yang et al. (2004) Nature 428:561-564), особенно при усечении на С-конце.

[0802] например, ген Спайка SARS клонирован в pCMVKm2 (Zur Megede et al., J. Virol., 74: 2628-2635, 2000; SEQ ID NO: 9923) использование стандартные методы РТ-ПЦР. Oligo Sp-RT-R использовано для обратного шаг транскрипции с набором предварительной амплификации Superscript (Invitrogen). Для этапа амплификации преимущество кднк-полимеразы набор (Clontech) использован с праймерами Sp-F-EcoRI (SEQ ID NO: 7329) и Sp-R-XbaI (SEQ ID NO: 7330).

[0803] передний праймер был разработан, чтобы содержать CCACC (SEQ ID NO: 7331) последовательность перед кодоном АТГ для оптимизации перевода эффективность (Козак 1991, там же.) о гене Спайка. Кроме того, форвард праймер содержит место ограничения EcoRI и обратный праймер содержит сайт ограничения XbaI для последующего клонирования ПЦР амплифицированный ген.

[0804] продукт ПЦР очищается с помощью удаления нуклеотида QIAquick набор, переваренный с XhoI и NotI, гель очищенный с Qiaquick Gel Экстракционный набор и лигатура к плазмиде pCMVKm2, предварительно переваренной этим же способом ферменты. Клоны, содержащие последовательность шипов SARS, проверяются с помощью секвенирование и новая конструкция называется pCMVKm2-SARSSpike.

[0805] экспрессия спайкового гена атипичной пневмонии верифицируется транзиторным методом трансфекция ВНК или 293 клеток с 2. μ g любой плазмидной ДНК pCMVKm2-SARSSpike или pCMVKm2 предварительно инкубировали в течение 5 минут с 5. μ l из Транзитный Полиаминовый реагент (Mirus) в низкой сывороточной среде Optimem (Life Технологии). Через 48 часов *pos*-трансфекции клетки лизировали и брали пробы лизат запускается на 8% SDS-странице. Белки на геле являются либо окрашивают или переносят на мембрану для анализа Western blot с помощью сывороток от выздоравливающих пациентов, или альтернативно используя мышь или кролика антисыворотка.

[0806] плазмиды pCMVKm2-SARSSpike вводится реципиенту вакцины (например, грызун, нечеловеческий примат, человек) как сформулированный или несформулированный плазмидная вакцина, описанная в другом месте настоящего изобретения.

[0807] аналогичным образом, гены, кодирующие другие антигены вируса SARS (например, белок нуклеокапсида, мембранный гликопротеин) клонируются в плазмиду векторы выражения

3. Вирусоподобные частицы, содержащие антигены SARS

[0808] вирусные антигены SARS изобретения могут быть сформулированы в виде Вирус, Как Частицы ("VLPs"). Таким образом, изобретение включает в себя вирус-подобный частицы (или VLPs), содержащие один или несколько вирусных антигенов SARS. Предпочтительно, чтобы VLPs содержали один или несколько выбранных вирусных антигенов SARS из группы, состоящей из Спайка (S), нуклеокапсида (N), мембраны (M) и конверт (E). Предпочтительно, чтобы VLP содержали по меньшей мере м и Е.

[0809] VLP изобретения содержат по меньшей мере одну частицу-образующую полипептид. Предпочтительно выбран указанный частицеобразующий полипептид из структурного белка коронавируса. В одном варианте осуществления, the частицеобразующий полипептид выбирается из одного или нескольких вирусных ОРВИ антигены. В другом варианте осуществления, частицеобразующий полипептид является выбранный от структурного протеина коронавируса не-торс, как, например, вирус мышинного гепатита.

[0810] VLPs могут быть сформированы, когда вирусные структурные белки выражены в эукариотические или прокариотические системы экспрессии. По выражению, то структурные протеины само-собирают для того чтобы сформировать частицы. Как вариант, вирусный структурные белки могут быть выделены из всего вируса и сформулированы с помощью фосфолипиды. Такие вирусные структурные белки упоминаются здесь как "полипептиды, образующие частицы". VLPs не являются инфекционными, потому что нет вирусных геном присутствует, однако, эти нереплицирующиеся вирусные капсулы имитируют строение нативных вирионов.

[0811] благодаря своей структуре, VLPs может отображать большое количество антигенные участки на их поверхности (похожие на нативный вирус). Предложение VLPs преимущество живых или ослабленных вакцин в том, что они намного безопаснее как производить, так и применять, так как они не являются инфекционными. VLPs имеют было показано, что они индуцируют как нейтрализующие антители, так и Т-клетки ответы и могут быть представлены как классом I, так и II МНС-путями.

[0812] предыдущая работа по созданию VLPs из коронавируса показывает, что Е и М белков вдоль может быть достаточно для формирования коронавируса VLP. Видеть Фишер и др., J. Virol. (1998) 72:7885-7894 и Веннема и др. EMBO J. (1996) 15:2020-2028.

[0813] химерные СБП, содержащие частицеобразующие полипептиды или порции в изобретение также включены оные из коронавирусов, не вызывающих ОРВИ. Такие частицеобразующие полипептиды могут содержать полноразмерный полипептид от коронавируса, не вызывающего ОРВИ. Альтернативно, частицеобразующий фрагмент можете использовать.

[0814] в одном варианте осуществления фрагмент частицы, не образующей торс полипептид и фрагмент вирусного антигена SARS сливаются вместе. Например, такие химерные полипептиды могут составлять эндодомен и трансмембранный домен не-SARS частицеобразующего полипептида и эктодомен вирусного антигена SARS. В одном примере, VLPs из изобретение содержит химерный спайковый белок, содержащий эндодомен и трансмембранный домен спайкового белка вируса гепатита мышей (MHV) и химерный протеин шипа более добавочно состоит из ectodomain Атипичный спайковый белок. Такие VLP могут дополнительно содержать коронавирус м и Е белковая пища. Указанные белки М и Е могут быть отобраны из любого коронавируса, включая вирус гепатита мыши (MHV) или SARS. Примеры последовательностей S, М А Е-белки MHV включены в цифры, приведенные выше.

[0815] химерные спайковые белки, полученные из эктодомена кошки инфекционный вирус перитонита (FIPV) спайковый белок сливается с эндо и трансмембранные Домены спайкового белка MHV были получены ранее раскрытый. Смотрите WO 98/49195 и WO 02/092827. В этих химерных VLP структуры, структура capsid VLPs сформирована М и Е белок MHV. Химерный спайковый белок обеспечивает поверхность экспонирование эктодомена спайкового белка FIPV.

[0816] как используется здесь, термин "вирусоподобная частица "или" VLP " относится к нереплицирующаяся, пустая оболочка вируса. VLP, как правило,

состоят из одного или больше вирусных белков, таких как, но не ограничиваясь этими белками обозначается как капсид, слой, оболочка, поверхностные и/или огибающие белки, или частицеобразующие полипептиды, полученные из этих белков. VLPs может сформировать самопроизвольно на рекомбинантной экспрессии протеина в An argrgrgrate система выражения. Кроме того, вирусные структурные белки может быть выделен из всего вируса и сформулирован с фосфолипидами. Способы получения конкретных Влп известны в данной области техники и обсуждаются подробнее ниже. Наличие VLPs в составе может быть обнаружено используя обычные методы известные в искусстве, как электрон микроскопия, рентгеновская кристаллография и тому подобное. См., например, дело Бейкера и др., Биофизика. J. (1991) 60:1445-1456; Hagensee et al., J. Virol. (1994) 68:4503-4505. Например, криоэлектронная микроскопия может быть выполнена на витрифицированные водные образцы рассматриваемого препарата ВЛП и изображения записано при соответствующих условиях экспозиции.

[0817] фраза "частицеобразующий полипептид" включает в себя полнометражный или почти полнометражный вирусный белок, а также его фрагмент, или а вирусный белок с внутренней делецией, обладающий способностью формировать VLPs при условиях, благоприятствующих образованию ВЛП. Соответственно, полипептид может состоять из полнометражной последовательности, фрагментов, усеченных и частичных последовательности, а также аналогично и формы-предшественники эталона молекула. Таким образом, этот термин включает в себя исключения, добавления и замены к последовательности, покуда полипептид сохраняет возможность формирования ВЛП. Таким образом, термин включает в себя естественные вариации указанный полипептид, так как часто происходят изменения в белках пальто между вирусными изолятами. Этот термин также включает в себя удаление, добавление и замены, которые естественным образом не происходят в эталонном белке, поэтому до тех пор, пока белок сохраняет способность образовывать ВЛП.

[0818] предпочтительными заменами являются те, которые являются консервативными в природе, то есть те замещения, которые имеют место в пределах одной семьи аминокислоты которые отнесены в их бортовых цепях. В частности, аминокислоты вообще разделены в 4 семьи: (1) кислотный: аспарат и глутамат; (2) основной: лизин, аргинин и гистидин; (3) неполярный: аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан; и (4) незаряженные полярные: глицин, аспарагин, глутамин, цистин, Серин, теронин, тирозин. Фенилаланин, триптофан, и тирозин иногда классифицируют как ароматические аминокислоты. Например, вполне предсказуемо, что изолированное замещение лейцина на изолейцин или валин, аспарагиновая кислота с глутаматом, треонин с глутаматной кислотой. Серин, или подобная консервативная замена аминокислоты с а структурно родственная аминокислота, не будет иметь главное влияние на биологическая активность. Белки, имеющие по существу одну и ту же аминокислоту последовательность как опорная молекула, но обладающая малой аминокислотой замены, которые существенно не влияют на иммуногенность протеин, поэтому в пределах определения ссылки полипептид.

[0819] VLPs изобретения могут быть сформированы из любого вирусного белка, образующий частицы полипептид, полученный из вирусного белка, или комбинация вирусных белков или их фрагментов, которые имеют возможность образования частиц при соответствующих условиях. То требования к частицеобразующим вирусным белкам таковы, что если частица образуется в цитоплазме клетки хозяина, белок должен быть достаточно устойчив в клетке-хозяине, в которой он выражен таким образом, что образование вирусоподобных структур приведет и к тому, что полипептид автоматически соберет в вирусоподобную структуру в клетке используется рекомбинантная экспрессионная система. Если протеин сделан секретным в культуральные среды, условия можно отрегулировать такие что VLPs сформируют. Furthermore, частиц-формируя протеин не должен быть цитотоксическим в выражение host и не должно быть в состоянии реплицировать в Хосте, в котором будет использоваться VLP.

[0820] предпочтительными частицеобразующими полипептидами являются коронавирус М и Е белки, предпочтительно SARS М и Е белки.

[0821] способы и подходящие условия для формирования частиц из широкого разнообразие вирусных белков известно в искусстве. Были произведены VLPs, например, из белков, полученных из вируса гриппа (таких как HA или NA), вирус гепатита В (как протеины сердечника или capsid), гепатит Е вирус, вирус кори, Синдбис-вирус, ротавирус, ящур вирус, ретровирус, вирус Norwalk, вирус папилломы человека, ВИЧ, РНК-фаги, В. бета-фаг (например, белки оболочки), га-фаг, фр-фаг, фаг AP205, и Ty (как протеин P1 retrotransposon Ty). Обсуждаются VLPs далее в WO 03/024480, WO 03/024481 и Niikura et al., Вирусология (2002) 293:273-280; Lenz et al., J. Иммунология (2001) 5246-5355; Pinto, и др., J. инфекционные заболевания (2003) 188:327-338; и Гербер и др., J. Вирусология (2001) 75(10):4752-4760.

[0822] как было объяснено выше, VLPs могут самопроизвольно формироваться, когда частицеобразующий полипептид, представляющий интерес, рекомбинантно экспрессируется в An соответствующая клетка хозяина. Таким образом, Влп для использования в настоящем изобретении может быть приготовлено с использованием рекомбинантных методов, хорошо известных в искусстве. В в связи с этим гены, кодирующие рассматриваемый полипептид, образующий частицы может быть выделен из библиотек ДНК или непосредственно из клеток и тканей содержащие то же самое, используя известные методы. Гены, кодирующие частицы-образующие полипептиды также могут быть получены синтетически, на основе об известных последовательностях. Последовательность нуклеотида можно конструировать с соответствующие кодоны для конкретной желаемой аминокислотной последовательности. В общем, один из них будет выбирать предпочтительные кодоны для предполагаемого хоста, в котором последовательность будет выражена (например, кодоны человека для вакцин ДНК человека). Полная последовательность вообще собрана от перекрывать олигонуклеотиды, полученные стандартными методами и собранные в А полная последовательность кодирования. Видеть., например, край, природа (1981) 292: 756; Nambair et al. Science (1984) 223:1299; Jay et al., J. Biol. Хим.. (1984) 259:6311.

[0823] один раз кодирующие последовательности для получения нужных частиц-образующих полипептиды были выделены или синтезированы, их можно клонировать в любой подходящий вектор или репликон для выражения. Многочисленные векторы клонирования известны те из мастерства в этом искусстве, и выбор An соответствующий вектор клонирования-это вопрос выбора. Смотрите, вообще, Sambrook et al. Затем вектор используется для преобразования соответствующего хоста ячейка. Соответствующие системы выражения включают, но не ограничены к, бактериальный, млекопитающий, бакуловирус / насекомое, vaccinia, вирус леса Semliki (SFV), дрожжи и системы экспрессии Ксенопуса, хорошо известные в искусстве.

[0824] ряд клеточных линий, пригодных для использования в качестве клеток-хозяев для изготовления Влп по изобретению известны в ст. Подходящий клеточные линии млекопитающих включают, но не ограничиваются этим, китайского хомяка Клетки яичника (CHO), клетки HeLa, клетки почки хомячка младенца (ВНК), обезьяна клетки почек (COS), клетки гепатоцеллюлярной карциномы человека (например, Hep G2), Клетки почки Madin-Darby bovine ("MDBK"), а также другие. Млекопитающий источники клеток включают, но не ограничиваются ими, человека или нечеловека примат (например, MRC-5 (ATCC CCL-171), WI-38 (ATCC CCL-75), ха, человек эмбриональные клетки почек (293 клетки, как правило, трансформируются путем стрижки ДНК аденовируса типа 5), клетки VERO из почек обезьян (в том числе, например пример клетки COS7), лошадь, корова (например, клетки MDBK), овца, собака (например, Клетки MDCK из почек собаки, ATCC CCL34 MDCK (NBL2) или MDCK 33016, номер депозита DSM ACC 2219 как описано в WO 97/37001), кошка и грызун (например, клетки хомяка как ВНК21-F, клетки НКСС, или китайский хомяк клетки завязи (клетки CHO)), и могут быть получены от большого разнообразия этапы развития, в том числе, например, взрослый, неонатальный, фетальный, и эмбрион.

[0825] бактериальные хозяева, пригодные для получения СБП изобретения включите E. coli, Bacillus subtilis и Streptococcus spp. Дрожжевые хозяева пригодные для производства Влп изобретения включают сахаромидеты cerevisiae, Candida albicans, Candida maltosa, hansenula polymorpha, Kluyveromyces fragilis, Kluyveromyces lactis, Pichia guilliermondii, Pichia pastoris, Schizosaccharomyces pombe и Yarrowia lipolytica. Клетки насекомых, пригодные для производства Влп данного изобретения (т. е. через векторы экспрессии бакуловируса) включают Aedes aegypti, Autographa californica, Bombyx mori, Drosophila melanogaster, Spodoptera frugiperda, и Трихопелос н.и.

[0826] вирусные векторы могут быть использованы для получения частиц в эукариотические клетки, такие как клетки, полученные из семейств вирусос оспы, в том числе вирус оспы птиц и вакцин. Дополнительно, на основе вакцины системы инфекции / трансфекции, такие как описанные в Tomei et Аль., J. Virol (1993) 67:4017-4026 и Selby et al., J. Gen. Virol. (1993) 74: 1103-1113, может также использоваться для генерации VLPs изобретения. В эта система, клетки сначала трансфецируется in vitro с вирусом vaccinia рекомбинантный, который кодирует РНК-полимеразу бактериофага T7. Этот полимеразы только транскрибирует шаблоны, несущие промоторы T7. Следующий инфекция, клетки трансфецируются с ДНК, представляющей интерес, движимый T7 промотор. Полимераза, экспрессируемая в цитоплазме из вакцины вирус рекомбинантный транскрибирует перенесенную ДНК в РНК, которая затем переведено в протеин машинным оборудованием перевода хозяина. Метод обеспечивает высокий уровень, транзитную, цитоплазматическую продукцию крупных количество РНК и продуктов ее трансляции.

[0827] в зависимости от выбранной системы выражения и Хоста, VLP являются произведено путем расти клетки хозяина преобразованные вектором выражения под условия, при которых происходит экспрессия частицеобразующего полипептида и VLPs может быть сформирован. Подбором соответствующих условий роста является: в пределах мастерства этого искусства. Если VLPs сформированы внутриклеточно, то клетки затем разрушаются, используя химические, физические или механические средства, которые лизируют клетки, но все же сохраняют VLPs существенно неповрежденными. Такой метод известен те из мастерства в этом искусстве и описаны в, например, Применение Очистки Белков: Практический Подход, (E. L. V. Harris и S. Angal, Eds., 1990).

[0828] частицы после этого изолированы используя методы которые сохраняют их целостность, например, путем градиентного центрифугирования, например, цезия градиенты хлорида (CsCl) и сахарозы и тому подобное (см., например, Kimbauer и др., J. Virol. (1993) 67:6929-6936), ионообменная хроматография (включая анионообменную хроматографию, такую как DMAE и TMAE), хроматография гидроксипатита (см. WO 00/09671), гидрофобное взаимодействие хроматография, фильтрация геля хроматография и другая фильтрация такие методы, как нанометрическая фильтрация и ультрафильтрация. Предпочтительно на во время очистки выполняется хотя бы одна анионообменная стадия, и более предпочтительно использовать по крайней мере два этапа обмена анионами.

[0829] рецептуры ВЛП изобретения могут быть дополнительно обработаны с помощью методы известные в искусстве для того чтобы демонтировать VLPs в более малое, протеин содержащие фрагменты с использованием высокой концентрации восстановителя, затем следует повторная сборка VLPs путем либо удаления сокращения агент или добавлением сверхнормального оксиданта. Полученные вновь собранные VLPs может иметь улучшенную однородность, стабильность и иммуногенные свойства. В кроме того, могут быть сформулированы дополнительные терапевтические или профилактические средства в VLPs после повторной сборки. См. McCarthy et al., J. Вирусология (1998) 72(1):32-41. Смотрите также WO 99/13056 и WO 01/42780. Восстановитель соответствующий для пользы в разборке VLP включите сульфгидрильные разбавители (как глутатион, бета меркаптоэтанол, дитиотреитол, дитиозинитрит, цистеин, сероводород и их смеси) предпочтительно содержится в буферах с умеренной или низкой ионной силой. Достаточная выдержка VLPs к разбавителю будет требуется для достижения подходящего количества разборки VLP.

[0830] адъюванты могут быть добавлены к Влп данного изобретения для повышения эффективности иммуногенность вирусных антигенов ОРВИ. Антигены, пригодные для использования с Влп включают в себя те, которые описаны выше. Например, VLPs из списка изобретение может быть адсорбировано на алюминиевом адъюванте.

[0831] Влп изобретения могут быть сформулированы для повышения их эффективности. стабильность. Дополнительные компоненты, которые могут повысить стабильность VLP состав включает соли, буферы, неионные поверхностно-активные вещества и др. стабилизаторы, такие как полимерные полианионные стабилизаторы. Смотрите WO 00/45841.

[0832] ионная прочность раствора, содержащего частицы VLP, может быть равна поддерживается за счет наличия солей. Почти любая соль, которая может внести свой вклад для контроля ионной силы могут быть использованы. Предпочитаемые соли которые смогут быть использовано для того чтобы отрегулировать ионную прочность включите физиологически приемлемые соли, такие как NaCl, KCl, Na.SUB.2co.SUB.4, (NH.SUB.4).SUB.2co.SUB.4, фосфат натрия и цитрат натрия. Предпочтительно, чтобы солевой компонент был присутствует в концентрациях от около 0,10 м до 1 м. Очень высокая концентрации не предпочтены должны к практически ограничениям парентеральное введение высоких концентраций солей. Вместо этого, более умеренный концентрации соли, такие как более физиологические концентрации около 0,15 м до около 0,5 м с 0,15 м-0,32 м NaCl предпочтительны.

[0833] буферы могут также использоваться для повышения стабильности VLP формулировки изобретения. Предпочтительно, буфер оптимизирует VLP стабильность при сохранении диапазона pH так, чтобы рецептура вакцины не будет раздражать получателя. Буферы предпочтительно поддерживают pH вакцинной композиции в пределах р/ч 5,5-7,0, более предпочтительно 6,0-6,5. Известны буферы, пригодные для вакцинных составов в состав Арт также входят, например, гистидин и имидазол. Предпочтительно, концентрация буфера будет колебаться от около 2 mM до около 100 mM, более предпочтительно от 5 mM до примерно 20 mM. фосфатсодержащие буферы являются как правило, не рекомендуется, когда VLP адсорбируется или иным образом сформулирован с соединением алюминия.

[0834] неионогенные поверхностно-активные вещества могут быть использованы для повышения стабильности ВЛП рецептуры изобретения. Поверхностно-активные вещества, пригодные для использования в составе вакцин известны в области техники и включают, например, сложные эфиры полиоксиэтиленсорбитных жирных кислот (Полисорбаты), такие как Полисорбат 80 (например, TWEEN 80), полисорбат 20 (например, TWEEN 20), полиоксиэтиленалкиловые эфиры (например, Brij 35, Brij 58), а также другие, включая Triton X-100, Triton X-114, NP-40, Span 85 и Pluronic серия неионных поверхностно-активных веществ (например, Плуороник 121). Поверхностно-активное вещество является предпочтительно присутствует в концентрации от около 0.0005% до около 0.5% (wt / vol).

[0835] полимерные стабилизаторы полианиона могут также быть использованы для того чтобы enhance стабильность рецептур ВЛП изобретения. Подходящий полимерный материал полианионные стабилизаторы для использования в изобретении содержат либо один длинная цепь или множественные перекрестные Соединенные цепи; любой тип обладающая множественные отрицательные заряды вдоль цепей когда в решении. Примеры: соответствующие полианионные полимеры включают протеины, полианионы, пептиды и полинуклеиновые кислоты. Конкретные примеры включают карбоксиметилцеллюлозу, гепарин, полиаминовые кислоты (такие как Поли (Glu), Поли (Asp) и Поли (Glu, Phe), окисленный глутатион, полинуклеотиды, РНК, ДНК и сывороточные альбумины. Концентрация стабилизаторов полмерного полианиона предпочтительна от около 0,01% до около 0,5%, в частности около 0,05-0,1% (по весу).

G. пассивная иммунизация с помощью антител к антигенам атипичной пневмонии Изобретение

[0836] изобретение включает антитела, специфичные к антигенам атипичной пневмонии изобретение и способы лечения или профилактики вируса ОРВИ родственное заболевание путем вводить эффективное количество антител к SARS на тему млекопитающих. Антитела специфические антигены SARS могут быть произведенный одним умелым в искусстве. Предпочтительно, чтобы антитела были специфический к протеину шипа (ов) вируса атипичной пневмонии. Сильнодействующий нейтрализация коронавируса ОРВИ с помощью моноклонального препарата человека было сообщено об анти-спайковых антителах (Sui et al. (2004) PNAS USA 101:2536-2541). Форма IgG1 моноклонального антитела показала более высокий уровень сродство (1.59 nM) чем форма scFv (32.3 nM).

[0837] антитела изобретения специфичны и селективны к ОРВИ антигены.

[0838] в одном варианте осуществления получены антитела по изобретению путем введения животному антигена атипичной пневмонии. Этот метод также может включать в себя выделение антител из организма животного.

[0839] антитела по изобретению могут быть поликлональными или моноклональными антителные препараты, моноспецифические антисыворотки, человеческие антитела, или может быть гибридные или химерные антитела, такие как гуманизированные антитела, измененные антитела (Fab').SUB.2 фрагмента, F (ab) фрагменты, FV фрагменты, однодоменные антитела, димерные или тримерные фрагменты антител или конструкции, мини-тела или их функциональные фрагменты, которые связываются с речью идет об антигене.

[0840] антитела получают с использованием методов, хорошо известных тем из них, которые: мастерство в этом искусстве раскрывается и в, например, США Пат. № 4011308; 4 722 890; 4 016 043; 3 876 504; 3 770 380 и 4 372 745. Например, поликлональные антитела произведены путем иммунизировать соответствующее животное, такие как мышь, Крыса, Кролик, Овца или коза, с антигеном, представляющим интерес. В чтобы повысить иммуногенность, антиген можно связать с носителем до начала иммунизации. Такие носители хорошо известны тем из обычных мастерство в этом искусстве. Иммунизация обычно проводится путем смешивания или эмульгирование антигена в физиологическом растворе, предпочтительно в адъюванте, таком как Полный адъювант Фрейнда, и впрыскивать смесь или эмульсию парентерально (обычно подкожно или внутримышечно). Животное есть вообще форсированный 2-6 неделям позже с одними или больше впрысками антиген в физиологическом растворе, предпочтительно с использованием неполного

адьюванта Фрейнда. Антитела также могут быть получены путем иммунизации *in vitro*, используя методы известный в этом искусстве. Поликлональная антисыворотка после этого получена от иммунизированное животное.

[0841] моноклональные антитела, как правило, получают с использованием метода Kohler & Milstein (1975) Nature 256:495-497, or a modification of them. Как правило, мышь или крыса иммунизируются, как описано выше. Кролики могут также быть использованы. Однако, вместо того, чтобы кровотоцит животное, чтобы извлечь сыворотку, селезенка (и необязательно несколько крупных лимфатических узлов) удаляется и диссоциирует на отдельные клетки. При желании клетки селезенки могут быть экранированный (после удаления не-специфически адгезивных клеток) путем прикладывать а клеточная суспензия к пластинке или хорошо покрыта антигеном. В-клетки, выражающ мембран-связанный специфический иммуноглобулина для антигена, будет привяжите к тарелке, и не смывайте вместе с остальными частями тела подвеска. Полученные в-клетки, или все диссоциированные клетки селезенки, являются затем индуцированные к слиянию с миеломой клетки образуют гибридомы и культивируются в селективной среде (например, гипоксантин, аминоптерин, тимидиновая среда, "ШЛЯПА"). Полученные гибридомы покрываются путем предельного разведения и являются проанализировано для продукции антител которые связывают специфически к иммунизирующий антиген (и который не связывается с несвязанными антигенами). То отобранные моноклональные антитело-секретирующие гибридомы затем культивируют либо *in vitro* (например, в бутылках с тканевой культурой или полым волокном реакторы), или *in vivo* (например, как асцит у мышей).

[0842] Humanized и химерные антитела также полезны в изобретение. Гибридные (химерные) молекулы антитела обычно обсуждаются зимой и др. (1991) Nature 349: 293-299 и U. S. Pat. № 4.816.567. Гуманизированные молекулы антитела обычно обсуждаются в Riechmann et al. (1988) Nature 332: 323-327; Верхоян и др. (1988) Science 239:1534-1536; и британская патентная публикация№. GB 2,276,169, опубликовано 21 Sep. 1994). Один из подходов к разработке гуманизированного антитела включает клонирование рекомбинантная ДНК, содержащая промотор, лидер и вариабельную область последовательности от гена антитела мыши и экзоны постоянн-зоны от а ген антител человека для создания химеры мыши-человека, гуманизированной антитело. См. вообще, Кьюби, " Иммунология, 3.отхлебывать.rd Edition", W. H. Freeman and Company, New York (1998) на стр. 136.

[0843] фрагменты антител, которые сохраняют способность распознавать атипичную пневмонию антиген также входит в сферу применения изобретения. Ряд из них: в искусстве известны фрагменты антител, которые содержат антигенсвязывающие вещества сайты, способные проявлять иммунологические связывающие свойства интактного организма молекула антитела. Например, функциональные фрагменты антител могут быть производится путем расщепления постоянной области, не отвечающей за антиген связывание, из молекулы антитела, используя, например, пепсин, для получения F (ab')₂ фрагмента. Эти фрагменты будут содержать два связывания антигена сайты, но не хватает части постоянной области от каждого из тяжелых цепи. Аналогично, при желании, FАВ фрагменты, содержащие один антиген сайт связывания, может быть получен, например, путем переваривания поликлонального или моноклональные антитела с папаином. Функциональные фрагменты, includnig только переменные зоны тяжелых и светлых цепей, можно также произвести, используя стандартные методы как рекомбинантная продукция или предпочтительный протеолитическое расщепление молекул иммуноглобулинов. Эти фрагменты являются известный как F. sub.v. см., например, Inbar et al. (1972) Proc. Натуральный. Акад. Sci USA 69:2659-2662; Hochman et al. (1976) Biochem 15:2706-2710; и Ehrlich et Аль. (1980) Biochem 19:4091-4096.

[0844] одноцепочечный полипептид Fv ("sFv" или scFv") является ковалентным linked V. sub.H-V. sub.L гетеродимер, который экспрессируется из слияния генов в том числе и В. суб.С - и В. саб.L-кодирующие гены, связанные а пептид-кодирующий линкер. Хьюстон и др. (1988) Proc. Натуральный. Акад. Sci. США 85:5879-5883. Ряд методов были описаны для того чтобы различить и разработка химических структурообразователей (линкеров) для преобразования природного агрегированные, но химически разделенные легкие и тяжелые полипептидные цепи от зоны антитела V в молекулу sFv которая сложит в а трехмерная структура по существу аналогична структуре Ан антиген-связывающий сайт. Смотрите, например, US Pat. № 5 091 513; 5 132 405; и 4,946,778. Молекулы sFv могут быть получены с использованием методов, описанных в thea rt. см., например, Huston et al. (1988) Proc. Натуральный. Акад. Sci USA 85: 5879-5338; U. S. Pat. № 5 091 513; 5 132 405 и 4 946 778. Дизайн критерии включают в себя определение соответствующей длины для покрытия расстояния между С-концом одной цепи и N-концом другой, при этом линкер обычно образуется из мелких гидрофильных аминокислот остатки, которые не свертываются спиралью и не образуют вторичных структур. Такие методы имеют были описаны в ст. Смотрите, например, US Pat. № 5,091,513; 5,132,405 и 4 946 778. Соответствующие линкеры вообще состоят из цепей полипептида чередующиеся наборы остатков глицина и серина, а также может включать глутаминовую остаток кислоты и лизина вводятся для повышения растворимости. Анти-Спайк scFv были сообщены антитела (Sui et al. (2004) PNAS USA 101: 2536-2541).

[0845] "мини-антитела" или "мини-антитела" также найдут применение а настоящее изобретение. Minibodies цепи полипептида sFv которые включают Домены олигомеризации на их С-терминах, отделенные от сфв а шарнирная область. Pack et al., (1992) Biochem 31:1579-1584. То домен олигомеризации состоит из самоассоциирующихся соединений альфа- спирали, например, лейциновые молнии, которые могут быть дополнительно стабилизированы дополнительным дисульфидом узы. Домен олигомеризации сконструирован таким образом, чтобы быть совместимым с векторная складчатость через мембрану, мысль процесса для того чтобы облегчить внутри складчатость *in vivo* полипептида в функциональный связывая протеин. Как правило, мини-тела получают с использованием хорошо известных рекомбинантных методов в искусстве. См., например, Pack et al., (1992) Biochem 31: 1579-1584; Cumber и др. (1992) J. Иммунология 149B: 120-126.

[0846] нетрадиционные средства могут также использоваться для генерирования и идентификации приведены антитела к изобретению. Например, библиотека отображения фагов может быть экранированным для антител которые связывают к антигенам SARS изобретение. Смотрите вообще, Зигель, " Рекомбинантное моноклональное антитело Технология", Transfus. Клин. БИОЛЬ. (2002) 9(1): 15-22; Сидху, " Фага Дисплей в фармацевтической биотехнологии", Цурр. ОПИН. Биотехнол. (2000) 11 (6): 610-616; Шарон и др., "Рекомбинантное Поликлональное Антитело Библиотеки", Гребень. Хим.. Экрaн высокой пропускной способности(2000) 3(3): 185-196; и еще ... Schmitz et al., "Дисплей фага: молекулярный инструмент для поколения Антитела-Обзор", Placenta, (2000) 21 Supla: S106-12.

[0847] антитела по изобретению также могут быть получены путем введение полинуклеотидной последовательности, кодирующей антиген SARS в животное. Антиген атипичной пневмонии затем экспрессируется *in vivo*, и антитела, специфичные к антигену SARS, генерируются *in vivo*. Методы для полинуклеотидной доставки антигенов SARS изобретения являются обсуждается в разделе 4 ниже.

[0848] антитела по изобретению предпочтительно специфичны к вирус SARS.

Н. комбинации одного или нескольких из вышеперечисленных подходов в а Вакцина

[0849] композиции изобретения дополнительно содержат комбинации: одна или несколько композиций, рассмотренных выше. Например, в том, что изобретение включает композицию, содержащую аттенуированный вирус SARS и субъединица вирусного антигена ОРВИ.

I. комбинации антигенов торс и других респираторных вирусных антигенов

[0850] изобретение также относится к вакцинным препаратам, содержащим один или несколько антигенов вируса ОРВИ и один или несколько других респираторных вирусных антигены. Дополнительные респираторные вирусные антигены, пригодные для использования в изобретение включает антигены вируса гриппа, риновируса человека (HRV), вирус парагриппа (PIV), респираторно-синциальный вирус (RSV), аденовирус, метапневмовирус и риновирус. Дополнительный респираторный вирусный антиген может также быть от коронавируса, отличного от коронавируса SARS, такого как человеческий коронавирус NL63 (van der Hoek et al. (2004) Медицина Природы 10:368-373). Предпочтительно, дополнительный респираторный вирусный антиген является вирусный антиген гриппа.

[0851] изобретение также может содержать один или несколько бактериальных или вирусных компонентов антигены в сочетании с вирусным антигеном ОРВИ. Антигены могут быть использованы в одиночку или в любом сочетании. (См., например, WO 02/00249 описание использования комбинации бактериальных антигенов). Комбинации могут включать в себя: несколько антигенов из такого же возбудителя, несколько антигенов из различные патогены или несколько антигенов из одного и того же и из разных патогенные вещества. Таким образом, бактериальные, вирусные и / или другие антигены могут быть включены в таком же составе или смогите быть управлено к такому же предмету отдельно. Обычно предпочтительно, чтобы комбинации антигенов были использованный для того чтобы поднять иммунный ответ используйте в комбинациях.

[0852] не ограничивающие примеры бактериальных патогенов, которые могут быть использованы в изобретение включает дифтерию (см., например, Главу 3 вакцин, 1998 год, ЭЦП. Плоткин и Мортимер (ISBN 0-7216-1946-0), стафилококк (например, Золотистый стафилококк, как описано в Kuroda et al. (2001) Ланцет 357:1225-1240), холера, туберкулез, *S. tetani*, также известный как столбняк (См., например, Главу 4 книги "вакцины", 1998 год, eds. Плоткин и Мортимер (ISBN 0-7216-1946-0), стрептококки группы А и группы В (включая *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus agalactiae* и *Streptococcus пиогены*, как описано, например, в Watson et al. (2000) педиатр. Заражать. Дис. J. 19: 331-332; Rubin et al. (2000) Педиатр Клини. Норт-Ам. 47:269-284; Jedrzejewski et al. (2001) Microbiol Mol Biol Rev 65: 187-207; Schuchat (1999) Lancet 353: 51-56; GB патентные заявки 0026333.5; 0028727.6; 015640.7; Dale et al. (1999) Заразите Дис Клини Норт Ам 13: 227-1243; Ferretti et al. (2001) PNAS USA 98: 4658-4663), коклюш (См., например, Gustafsson et al. (1996) N. Engl. J. Med. 334:349-355; Раппуоли и др. (1991) ТИВТЕСН 9: 232-238), менингит, моракселла простудные заболевания (см., например, вакцину McMichael (2000) 19 Suppl. 1: S101-107) и другие патогенные состояния, в том числе, без ограничения, *Neisseria менингит* (А, В, С, Y), *Neisseria gonorrhoeae* (см., например, WO 99/24578; WO 99/36544; и WO 99/57280), *Helicobacter pylori* (например, CagA, VacA, NAP, HopX, HopY и / или уреазы, как описано, например, WO 93/18150; WO 99/53310; WO 98/04702) и гемофильный грипп. Гемофильный грипп тип В (Н1В) (см., например, Costantino et al. (1999) вакцина 17: 1251-1263), *Porphyromonas gingivalis* (Ross et al. (2001) вакцина 19:4135-4132) и их комбинации.

[0853] не ограничивающие примеры вирусных патогенов, которые могут быть использованы в изобретение включает в себя менингит, риновирус, грипп (Каваока и др., Вирусология (1990) 179:759-767; Webster et al., "Антигенная вариация среди вирусы гриппа типа А", С. 127-168. In: P. Palese and D. W. Kingsbury (ред.), Генетика вирусов гриппа. Springer-Verlag, Нью-Йорк), респираторно-синцитиальный вирус (РСВ), вирус паравируса (PIV), ротавирус (например, VP1, VP2, VP3, VP4, VP6, VP7, NSP1, NSP2, NSP3, NSP4 или NSP5 и другие антигены ротавируса, например как описано в WO 00/26380) и подобный. Антигены выведенные от других вирусов также найдут польза в настоящее изобретение, такое как, без ограничения, белки из членов семейства *Picomaviridae* (например, полиовирусы и др. как описано, для например, в работе Sutter et al. (2000) *Pediatric Clin North Am* 47:287-308; Zimmerman & Spann (1999) *Am Fam* 59: 113-118; 125-126); *Caliciviridae*; *Togaviridae* (например, вирус краснухи и др.); *Flaviviridae*, включая флавивирус родов (например, вирус желтой лихорадки, японский вирус энцефалита, серотипы вируса Денге, клещевой энцефалит вирус, вирус Западного Нила, вирус энцефалита Сент-Луиса); *pestivirus* (например, классический вирус лихорадки свиней, вирус вирусной диареи крупного рогатого скота, граница вирус болезни); и гепацитавирус (например, гепатит А, В и с, как описано выше, например, в США Пат. № 4,702,909; 5,011,915; 5,698,390; 6,027,729; и 6,297,048); парвовирус (например, парвовирус В19); *Coronaviridae*; *Reoviridae*; *Bimaviridae*; *Rhabdoviridae* (например, бешенство вирус и т.д. как описано, например, в Dressen et al. (1997) вакцина 15 Suppl:2-6; MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 16, 1998; 47(1):12, 19); *Filoviridae*; *Paramyxoviridae* (например, вирус эпидемического паротита, вирус кори, респираторно-синцитиальный вирус и др. как описано в главах 9-11 из Вакцины, 1998 год, ред. Плоткин и Мортимер (ISBN 0-7216-1946-0); *Orthomyxoviridae* (например, вирусы гриппа типов А, В и С и др. как описано в главе 19 книги "вакцины", 1998 год, eds. Плоткин и Мортимер (ISBN 0-7216-1946-0)); *Bunyaviridae*; *Arenaviridae*; *Retroviridae* (например, HTLV-1; HTLV-11; ВИЧ-1 (также известный как HTLV-III, LAV, ARV, HTL, R и др.)), в том числе, но не ограничиваясь антигенами из изолятов HIV11b, HIVSF2, HIVLAV, HIVI-AL, I-PIVMN, SF162); ВИЧ-1 CM235, ВИЧ-1 US4; ВИЧ-2; обезьяна вирус иммунодефицита (СИВ) среди других. Кроме того, антигены могут также быть получены из вируса папилломы человека (ВПЧ) и клещевого энцефалита вирусы энцефалита. См., например, Вирусология, 3.отхлебывать. rd Edition (W. K. Joklik ред. 1988); фундаментальная Вирусология, 2-е издание (Б. Н. поляков и Д. М. Кнуре, eds, 1991), для описания этих и других вирусов.

[0854] белки также могут быть получены из семейства герпесвирусов, включая белки, полученные из вируса простого герпеса (ВПГ) типов 1 и 2, такие как гликопротеины gB, gD и gH HSV-1 и HSV-2; полученные антигены от вируса ветряной оспы (VZV), вируса Эпштейна-Барр (EBV) и цитомегаловирус (CMV) включая CMV gB и gH (см., США Pat. Нет. 4,689,225 и публикация WO 89/07143 PCT); и антигены выведенные от другие человеческие герпесвирусы, такие как HHV6 и HHV7. (См., например, Chee et al., Цитомегаловирусы (J. K. McDougall, ed., Springer-Verlag 1990) pp. 125-169, для обзора содержания протеина кодирующая цитомегаловируса; McGeoch et al., J. Gen. Virol. (1988) 69: 1531-1574, для обсуждения следующих вопросов: различные белки, кодируемые ВПГ-1; U. S. Pat. № 5,171,568 для а обсуждение белков HSV-1 и HSV-2 gB и gD и кодирующих их генов поэтому; Baer et al., Nature (1984) 310:207-211, для идентификации белковых кодирующих последовательностей в геноме EBV; и Davison and Scott, J. Генерал Вироль. (1986) 67:1759-1816, для обзора VZV). Простой герпес вирус (HSV) rgD2 рекомбинантный протеин произведенный внутри genetically проектированные клетки завязи китайского хомяка. Этот протеин имеет нормальный Якорная область усечена, в результате чего секретируется гликозилированный белок в питательную среду ткани. GD2 можно очистить в средстве СНО к большая очищенность чем 90%. Вирус иммунодефицита человека (ВИЧ) env-2-3 является а рекомбинантная форма белка, оболочкаемого ВИЧ, полученная генетически инженерные *Saccharomyces cerevisiae*. Этот белок представляет собой весь белковая область ВИЧ gp120, но не является гликозилированной и денатурированной, как очищается от дрожжей. ВИЧ gp120-это полностью гликозилированная, секретруемая форма из gp120 производится в ячейках СНО способом, аналогичным приведенному выше gD2. Дополнительными антигенами ВПГ, пригодными для использования в иммуногенных композициях, являются описано в публикациях PCT W0 85/04587 и W0 88/02634, раскрытие информации о которых включено в настоящий документ путем ссылки на них целостность. Смеси антигенов gB и gD, которые имеют усеченную поверхность антигены, лишены якорных областей, особенно предпочтительны.

[0855] антигены из семейства вирусов гепатита, включая гепатит А вирус (HAV) (см., например, Bell et al. (2000) Педиатр-Инфекционист Дис. Дж. 19: 1187-1188; Iwarson (1995) APMIS 103: 321-326), вирус гепатита В (HBV) (См., например, Gerlich et al. (1990) Вакцина 8 Suppl: S63-68 & 79-80), вирус гепатита С (HCV) (см., например, PCT / US88 / 04125, опубликованный в Европе номер заявки 318216), вирус гепатита перапада (HDV), гепатит Е вирус (HEV) и вирус гепатита G (HGV), можно также удобно использовать внутри методы, описанные здесь. Например, вирусный геном известна последовательность HCV, а также способы получения этой последовательности. Видеть, например, Международная публикация № WO 89/04669; WO 90/11089; и WO 90/14436. Также в изобретение включены молекулярные варианты таких полипептиды, например как описано в PCT / US99 / 31245; PCT / US99 / 31273 и PCT / US99 / 31272. Геном HCV кодирует несколько вирусных белков, включая E1 (также известное как E) и E2 (также известное как E2/NSI) и an N-концевой белок нуклеокапсида (называемый "ядром") (см., Houghton et al., Гепатология (1991) 14: 381-388, для обсуждения белков ВГС, в том числе E1 и E2). Аналогично и последовательность для самого дельта.- антиген из HDV является известно (см., например, US Pat. No. 5,378,814) и этот антиген также может быть удобно использовать в настоящем составе и методиках. Дополнительно, антигены, полученные из HBV, такие как основной антиген, поверхностный антиген, SAg, а также поверхностные последовательности, pre-S1 и pre-S2 (ранее называется pre-S), а также комбинации из вышеперечисленного, такие как SAg / pre-S1, SAg / pre-S2, SAg/pre-S1/pre-S2 и pre-S1 / pre-S2 найдут здесь применение. Смотрите, например, "вакцины против HBV-от лаборатории до лицензи: тематическое исследование" in Mackett, M. and Williamson, J. D., Human Vaccines and Vaccination, pp. 159-176, для обсуждения структуры HBV; и Пат США. № 4,722,840, 5,098,704, 5,324,513, включенный здесь ссылкой в их целые; Beames et al., J. Virol. (1995) 69:6833-6838, Birnbaum et Аль., J. Virol. (1990)64: 3319-3330; и Чжоу и др., J. Virol. (1991) 65:5457-5464. Каждый из этих белков, а также антигенные фрагменты из них, найдут применение в настоящей композиции и методах.

[0856] вирус гриппа является еще одним примером вируса, для которого настоящее изобретение будет особенно полезно. В частности, конверт гликопротеины HA и NA гриппа А представляют особый интерес для выработка иммунного ответа. Многочисленные подтипы HA гриппа А имеют были идентифицированы (Kawaoka et al., Вирусология (1990) 179: 759-767; Webster et Аль., "Антигенные вариации среди вирусов гриппа типа А", С. 127-168. In: P. Palese and D. W. Kingsbury (ed.), Генетика вирусов гриппа. Springer-Verlag, New York). Таким образом, белки, полученные из любого из них изоляты также могут быть использованы в описанных композициях и методах здесь.

[0857] не ограничивающие примеры паразитарных антигенов включают производные от организмов, вызывающих малярию и болезнь Лайма.

[0858] способы осуществления изобретения включают введение иммуногенного препарата композиция, содержащая вирусный антиген атипичной пневмонии (включая один или несколько из следующих антигенов) инактивированный вирус ОРВИ, ослабленный вирус ОРВИ, расщепленный вирус ОРВИ препарат или рекомбинантная или очищенная субъединица, представляющая собой одну или более субъединиц еще ОРВИ вирусные антигены) к животному. Используемые иммуногенные композиции в состав изобретения может входить иммунологически эффективное количество Вирусный антиген ОРВИ. "Иммунологически эффективное количество" - это количество достаточно, чтобы позволить млекопитающему повысить иммунный ответ на ОРВИ антиген.

[0859] иммунный ответ предпочтительно включает продукцию антитела, специфичные к антигену ОРВИ. Количество антител произведенный будет варьироваться в зависимости от нескольких факторов, включая животное используется, наличие адьюванта и др.

[0860] иммуногенные композиции изобретения могут дополнительно содержать: один или несколько адьювантов.

[0861] могут быть введены иммуногенные композиции по изобретению слизисто. Соответствующие маршруты мукосал администрации включают устное, интраназально, внутримышечно, легочно, кишечное, ректально, окулярно и вагинальные маршруты. Иммуногенная композиция может быть адаптирована для слизистых оболочек администрации. Например, где композиция предназначена для орального применения администрации, оно может быть в форме таблеток или капсул, выборочно кишечн-покрынные, жидкостные, трансгенные заводы, etc. Где находится композиция для интраназального введения он может быть в виде назального спрея, назальные капли, гель или порошок.

[0862] могут быть введены иммуногенные композиции по изобретению парентерально. Подходящие маршруты парентерального введения включают: внутримышечно (им), подкожно, внутривенно, внутривенно, внутривенно, внутрикожно, чрескожно и трансдермально (см. Например, International патентная заявка WO 98/20734) маршруты, а также доставка до объекта интерстициальное пространство ткани. Иммуногенная композиция может быть приспособленный для парентерального введения, например в виде injectable которое может быть стерильно и рутоген свободно.

[0863] вакцины данного изобретения могут вводиться совместно с другие иммунорегуляторные агенты. В частности, композиции будут обычно включите адъювант. Предпочтительные дополнительные адъюванты включают, но не являются ограничивается одним или несколькими из нижеперечисленных пунктов:

A. Минералсодержащие Композиции

[0864] Минералсодержащие композиции, пригодные для использования в качестве адъювантов внутри изобретение включает минеральные соли, такие как соли алюминия и кальция соль. Изобретение включает минеральные соли, такие как гидроксиды (например оксигидроксиды), фосфаты (например, гидроксифосфаты, ортофосфаты), сульфаты и др. (например, см. главы 8 и 9 проекта вакцины: субъединица и адъювантный подход (1995) Powell & Newman. ISBN 0-306-44867-X), или смеси различных минеральных соединений, причем соединения принимают любые соответствующая форма (например гель, кристаллический, аморфический, etc.), а также с предпочтительна адсорбция. Минеральные содержащие композиции могут также сформулируйте как частица соли металла. Смотрите WO00 / 23105.

B. Масляные Эмульсии

[0865] масляно-эмульсионные композиции, пригодные для использования в качестве адъювантов в составе изобретение включает эмульсии сквален-вода, такие как MF59 (5% сквален, 0.5% Tween 80, и 0.5% Span 85, сформулированный в частицы субмикрона используя микрофлюидизатор). Смотрите WO90 / 14837. Смотрите также, Frey et al., "Сравнение безопасности, переносимости и иммуногенности а MF59-адъювантная гриппозная вакцина и неадъювантная гриппозная вакцина in non-elderly adults", Vaccine (2003) 21:4234-4237.

[0866] особенно предпочтительными адъювантами для применения в композициях являются: субмикронные водонефтяные эмульсии. Предпочтительное субмикронное масло в воде эмульсии для использования здесь являются сквален / водные эмульсии необязательно содержащ меня количество МТР-РЕ, как Субмикрон масл-в-Вода эмульсия, содержащая 4-5% W / v сквалена, 0,25-1,0% W / v твина 80.ТМ-да. (моноолеат полиоксисилтиленсорбитана), и / или пядь 0.25-1.0% 85.ТМ-да. (сорбитан триолеат), и, необязательно, N-ацетилмурамил-L-аланил-D-изоглютамил-L-аланин-2-(1' -2' - дипальмитоил-s- п-глицеро-3-гидроксифосфорилокси) - этиламин (МТР-РЕ), например, субмикронная эмульсия масло-в-воде известная как "MF59" (International Публикации Нет. WO 90/14837; U. S. Pat. № 6 299 884 и 6 451 325, включенный здесь путем ссылки в их всеохватности; и Ott et al., "MF59--разработка и оценка безопасного и мощного адъюванта для человека Вакцины " в разработке вакцин: субъединица и адъювантный подход (Powell, M. F. and Newman, M. J. eds.) Plenum Press, New York, 1995, PP. 277-296). MF59 содержит 4-5% W/v сквален (например, 4,3%), 0,25-0,5% w / v твин 80.ТМ-да., и 0,5% W/V пядь 85.ТМ. и выборочно содержит различное количество МТР-РЕ, сформулированное в частицы субмикрона используя microfluidizer такие как модель 110Y microfluidizer (Microfluidics, Newton, Mass.). Например, МТР-РЕ может присутствовать в количестве около 0-500. mu. g/dose, больше предпочтительно 0-250. mu. g / доза и наиболее предпочтительно, 0-100.mu. g/доза. As используемый здесь термин "MF59-0" относится к вышеуказанному субмикронному маслу в воде эмульсии не хватает МТР-РЕ, в то время как термин MF59-МТР обозначает рецептуру это содержит МТР-РЕ. Например, "MF59-100" содержит 100. mu.g МТР-РЕ за дозу, и так далее. MF69, другая субмикронная эмульсия масло-в-воде для используйте здесь, содержит 4,3% W/V сквален, 0,25% w / v твин 80.ТМ, и 0,75% W / V пядь 85.ТМ. и выборочно МТР-РЕ. Еще один Субмикрон масло-в-воде эмульсия MF75, также известная как SAF, содержащ 10% сквален, 0,4% Твин 80.ТМ, 5% pluronic-преграженный полимер L121, и thr-MDP, также микрофлюидизируется в субмикронную эмульсию. MF75-МТР обозначает MF75 формулировка, которая включает МТР, например от 100-400. mu. g МТР-РЕ в расчете доза.

[0867] субмикронные эмульсии типа масло-в-воде, способы их получения и иммуностимулирующие агенты, такие как пептиды мурамила, для использования в композиции, подробно описаны в международном издании No. WO 90114837 и США Пат. № 6.299.884 и 6451.325, включенные в настоящий документ по ссылкам во всей их полноте.

[0868] полный адъювант Фрейнда (CFA) и неполный адъювант Фрейнда (ИФА) может также быть использовано как адъюванты в изобретении.

C. Составы Сапонинов

[0869] образования сапонины, могут также быть использованы как адъюванты в изобретение. Сапонины представляют собой гетерологичную группу стероидных гликозидов и тритерпеноидные гликозиды, которые содержатся в коре, листьях, стеблях, корнях и даже цветы широкого спектра видов растений. Сапонин из коры из *Quillaia saponaria Molina* дерево были широко изучены как вспомогательное средство. Сапонин можно также коммерчески получить от *Smilax ornata* (сарсаприлла), *Гипсофилла метельчатая* (вуаль невесты) и сапония *officinalis* (мыльный корень). Адъювантные препараты сапонины включают очищенные составы, такие как QS21, а также липидные составы, такие как ISCOMs.

[0870] Сапониновые композиции были очищены с использованием высокой производительности Тонкослойная хроматография (HP-LC) и обратная фаза высокая производительность Жидкостная хроматография (RP-HPLC). Специфические очищенные фракции, использующие их были определены методы, включая QS7, QS17, QS18, QS21, QH-A, QH-B и QH-C. предпочтительно, сапонином будет QS21. Способ получения гексогена QS21 раскрывается в патенте США. № 5,057,540. Составы сапонинов могут также содержат стерол, такой как холестерин (см. WO 96/33739).

[0871] комбинации сапонинов и холестерина можно использовать для того чтобы сформировать уникальные частицы называются иммуностимулирующими комплексами (ISCOMs). ISCOMs типично также включите фосфолипид как фосфатидилэтаноламин или фосфатидилхолин. Любой известный сапонин может быть использован в ISCOMs. Предпочтительно, ISCOM включает один или несколько из Quil A, QHA и QHC. ISCOMs идут дальше описано в EP 0 109 942, WO 96/11711 и WO 96/33739. По желанию, то ISCOMS может быть лишен дополнительного моющего средства. Смотрите WO00 / 07621.

[0872] обзор развития адъювантов на основе сапонины может быть представлен следующим образом найдено в Bag, et al., "ISCOMs и другие адъюванты на основе сапонины", Расширенные Обзоры Доставки Лекарств (1998) 32:247-271. Смотрите также Sjolander, et Аль., "Поглощение и адъювантная активность перорально доставляемого сапонины и ISCOM вакцины", Advanced Drug Delivery Reviews (1998) 32:321-338.

D. бактериальные или микробные производные

[0873] адъюванты, пригодные для использования в изобретении, включают бактериальные или микробные производные, такие как:

[0874] (1) нетоксичные производные Энтеробактериального липополисахарида (ЛПС)

[0875] такие производные включают Монофосфорил липид а (MPL) и 3-О-деацелированный MPL (3dMPL). 3dMPL представляет собой смесь 3-Де-о-ацелированных монофосфорил липид а с 4, 5 или 6 ацилированными цепями. А предпочтительный "маленький частица " форма 3-Де-о-ацелированного

монофосфорильного липида а раскрыта в EP 0 689 454. Такие "мелкие частицы" 3dMPL достаточно малы, чтобы быть стерильное фильтрованное через мембрану 0,22 микронов (см. EP 0 689 454). Прочее нетоксичные производные ЛПС включают монофосфорил липид а имитаторы, такие как производные фосфата глюкозаминида аминоалкила например PK-529. Смотрите Johnson и др. (1999) Bioorg Med Chem Lett 9:2273-2278.

[0876] (2) Производные Липида А

[0877] производные липида А включают производные липида а от *Escherichia coli*, такие как OM-174. OM-174 описано например в Меральди и др., "Ом-174, новый адъювант с потенциалом для использования человеком, Индуцирует защитный ответ с введенным с синтетикой С-Концевой фрагмент 242-310 из белка циркумспорозоита *Plasmodium berghei*", Vaccine (2003) 21:2485-2491; и Pajak, et al., "Этот Адъювант ом-174 индуцирует как миграцию, так и созревание мышей дендритные клетки in vivo", вакцина (2003) 21:836-842.

[0878] (3) Иммуностимулирующие Олигонуклеотиды

[0879] иммуностимулирующие олигонуклеотиды, пригодные для использования в качестве адъювантов в изобретение входят нуклеотидные последовательности, содержащие CpG-мотив (а последовательность, содержащая неэтилированный цитозин, за которым следует гуанозин и связанные фосфатной связью). Бактериальная двухцепочечная РНК или олигонуклеотиды, содержащие палиндромные или Поли(dG) последовательности, также имеют было показано, что он является иммуностимулирующим.

[0880] CpG может включать нуклеотидные модификации / аналоги, такие как изменения фосфоротиоата и могут быть двухцепочечны или одноцепочечный. По желанию, гуанозин может быть заменен аналогом например, 2' - дезокси-7-дезагуанозин. См. Kandimalla, et al., "Расходящийся синтетическая картина опознавания мотива нуклеотида: дизайн и развитие мощные иммуномодулирующие олигодезоксирибонуклеотидные агенты с выраженными цитокиновыми профили индукции", исследование нуклеиновых кислот (2003) 31(9): 2393-2400; WO 02/26757 и wo 99/62923 для примеров возможного аналога замены. Адъювантное действие CpG олигонуклеотидов заключается в дальнейшем обсуждается в Krieg, "CpG мотивы: активный ингредиент в бактериальных выписки?", Медицина природы (2003) 9(7): 831-835; McCluskie, et al., "Парентеральные и мукозальные Прайм-форсируйте стратегии иммунизации в мышах с поверхностный антиген гепатита В и ДНК CpG", Fems иммунология и медицина Микробиология (2002) 32:179-185; WO 98/40100; U. S. Pat. No. 6,207,646; Американский Пат. № 6.239.116 и США Пат. № 6,429,199.

[0881] последовательность CpG может быть направлена на TLR9, например мотив GTCGTT или TTCGTT. См. Kandimalla, et al., "Toll-подобное приемное устройство 9: модуляция распознавание и индукция цитокинов новыми синтетическими CpG-ДНК", Биохимическое общество сделки (2003) 31 (часть 3): 654-658. ВПУ последовательность может быть специфична для индуцирования иммунного ответа Th1, такого как а CpG-A ODN, или он может быть более специфичен для индуцирования реакции в-клеток, такой CpG-B ODN. CpG-A и CpG-B ODNs обсуждаются в Blackwell, et Аль., "CpG-A-индуцированная Моноцитарная продукция IFN-гамма-Индубильного белка-10 является Регулируется Плазмацитондными дендритными клетками производного IFN-Альфа", J. Immunol. (2003) 170(8):4061-4068; Krieg, "From A to Z on CpG", TRENDS in Иммунология (2002) 23(2): 64-65 и WO 01/95935. Предпочтительно, CpG является а CpG-A ODN.

[0882] предпочтительно, CpG олигонуклеотид строится так, что 5' конец доступен для опознавания приемного устройства. По желанию, два CpG олигонуклеотидные последовательности могут быть прикреплены на их 3' концах с образованием "иммуномеры". См., например, Kandimalla и др., "Вторичная структура в CpG олигонуклеотиды влияют на иммуностимулирующую активность", BBRC (2003) 306:948-953; Кандималла и др., "Toll-подобное приемное устройство 9: модуляция распознавание и индукция цитокинов новыми синтетическими ППГ-ДНК", Биохимическое общество сделки (2003) 31 (часть 3): 664-658; Bhagat et Аль., "CpG Пента - и гексадеоксирибонуклеотиды в качестве мощных иммуномодуляторов агенты " BBRC (2003) 300:853-861 и WO 03/035836.

[0883] (4) АДФ-Рибозилирующие токсины и их Детоксифицированные производные.

[0884] бактериальные АДФ-рибозилирующие токсины и детоксифицированные производные они могут быть использованы в качестве адъювантов в изобретении. Желательно, чтобы белок получен из *E. coli* (т. е. *E. coli* нагревают лабильный энтеротоксин "ЛТ"), холера ("КТ") или коклюш ("ПТ"). Применение детоксикации АДФ-рибозилирующие токсины в качестве адъювантов слизистой оболочки описаны в WO 95/17211 и как парентеральные адъюванты при WO 98/42375. Предпочтительно, чтобы адъювант был а детоксифицированный мутант LT, такой как LT-K63, LT-R72 и LTR192G. Использование АДФ - рибозилирующие токсины и их детоксифицированные производные, в частности LT-K63 и LT - R72, как адъюванты можно найти в следующих ссылках, каждое из которых специфически включено ссылкой здесь в их полностью: Beignon, et al., "Мутант LTR72 теплолюбивого Энтеротоксина *Escherichia coli* Enhances способность пептидных антигенов вызывать CD4+ Т-клетки и секретируют гамма-интерферон после Коапликации на голые Кожа", инфекции и иммунитет (2002) 70(6):3012-3019; Пицца и др., "Мукозальные вакцины: нетоксичные производные ЛТ и КТ в качестве мукозальных вакцин адъюванты", вакцина (2001)19: 2534-2541; Пицца и др., "LTK63 и LTR72, два слизистых адъюванта готовы к клиническим испытаниям " Int. J. Med. Микробиол (2000) 290(4-5):455-461; Шаргон-Керстен и др., "Чрескожный Иммунизация бактериальными АДФ-Рибозилирующими Экзотоксинами, субъединицами и Несвязанные адъюванты", инфекция и иммунитет (2000) 68(9):5306-5313; Райан и др., "Мутанты теплолюбивого токсина *Escherichia coli* действуют так же эффективно Слизистые адъюванты для назальной доставки бесклеточной коклюшной вакцины: Дифференциальное влияние нетоксичного комплекса АБ и активности ферментов на Th1 и Th2 клетки " инфекция и иммунитет (1999) 67 (12): 6270-6280; Partidos et al., "Термолабильный энтеротоксин *Escherichia coli* и его производные сайт-направленный мутант LTK63 усиливает пролиферативные и цитотоксические Т-клетки реакция на интраназально иммунизированные синтетические пептиды", Иммунол. Латыш. (1999) 67(3):209-216; Пепполони и др., "Мутанты из эшерихии кишечная палочка термолабильный энтеротоксин в качестве безопасных и сильных адъювантов для интраназального введения поставка вакцин", вакцины (2003) 2(2):285-293; и сосна et al., (2002) "интраназальная иммунизация противогриппозной вакциной и детоксикацией мутант теплового лабильного энтеротоксина из *Escherichia coli* (LTK63) " J. Отпуск Управления (2002) 85(1-3):263-270. Числовой справочник для аминокислотные замены предпочтительно основаны на выравниваниях А и В субъединицы АДФ-рибозилирующих токсинов изложены в работе Domenighini et al., Моль. Микробиол (1995) 15(6): 1165-1167, специально включенный здесь мимо ссылка в полном объеме.

Е. Иммуномодуляторы Человека

[0885] иммуномодуляторы человека, пригодные для использования в качестве адъювантов в изобретение включает цитокины, такие как интерлейкины (например, IL - 1, IL-2, IL-4, Ил-5, ИЛ-6, Ил-7, Ил-12 и др.), интерфероны (например, интерферон-гамма.), макрофагальный колониестимулирующий фактор и фактор некроза опухоли.

Е. Биоадгезивы и Мукоадгезивы

[0886] Биоадгезивы и мукоадгезивы также могут быть использованы в качестве адъювантов в изобретение. Подходящие биоадгезивы включают в себя этерифицированную гиалуроновую кислоту микросферы (Singh et al. (2001) J. Продолжение. Реле. 70:267-276) или мукоадгезивы, такие как сшитые производные Поли (акриловой кислоты), поливиниловый спирт, поливинилпирролидон, полисахариды и карбоксиметилцеллюлоза. Хитозан и его производные также могут быть использованы как адъюванты в изобретении. Например, WO99 / 27960.

Г. Микрочастицы

[0887] микрочастицы также могут быть использованы в качестве адъювантов в изобретении. Микрочастицы (то есть частица .о нас.100 Нм к.о нас.150. m. m в диаметре, более предпочтительно .о нас.200 Нм к.о нас.30.m. m в диаметре, и самое главное .о нас.500 Нм к.о нас.10. m. m в диаметре) сформировал из материалов, которые являются биоразлагаемыми и нетоксичными (например а полиэстер(альфа. - гидроксикислота), полигидроксимасляная кислота, полиортоэфир, полиангидрид, поликапролактон и др.), с Поли (лактид-со-гликолид) предпочтительны, необязательно обработаны, чтобы иметь а отрицательно заряженная поверхность (например, с SDS) или положительно заряженная поверхность (например, с катионным моющим средством, таким как СТАВ).

Н. Липосомы

[0888] примеры составов липосом, пригодных для использования в качестве адъювантов описаны в американском Пат. No. 6,090,406, U. S. Pat. No. 5,916,588, и EP 0 626 169.

I. составы Полиоксиэтиленового эфира и Полиоксиэтиленового эфира

[0889] адъюванты, пригодные для использования в изобретении, включают: полиоксиэтиленовые эфиры и полиоксиэтиленовые эфиры. WO99 / 52549. Такой составы дополнительно включают поверхностно-активные вещества сложного полиоксиэтиленсорбитана в комбинации с октоксинолом (WO01/21207), а также полиоксиэтиленом алкиловые эфиры или сложноэфирные поверхностно-активные вещества в комбинации по меньшей мере с одним дополнительным неионным поверхностно-активным веществом, такое как октоксинол (WO01/21152).

[0890] предпочтительные полиоксиэтиленовые эфиры выбираются из следующих вариантов группа: полиоксиэтилен-9-лауриловый эфир (laureth 9), полиоксиэтилен-9-стеариловый эфир, полиоксиэтилен-8-стеариловый эфир, полиоксиэтилен-4-лауриловый эфир, полиоксиэтилен-35-лауриловый эфир, и полиоксиэтилен-23-лауриловый эфир.

J. Полифосфазен (ПХФП)

[0891] составы ПХФП описаны, например, в работе Андрианова и др., "Получение гидрогелевых микросфер коацервированием водных растворов полифаз растворов", биоматериалы (1998) 19(1-3): 109-115 и Рауне и др., "Высвобождение белка из Полифосфазеновых матриц", препарат ADV. Обзор Доставка(1998) 31(3):185-196.

Пептиды к. Мурамила

[0892] примеры мурамилпептидов, пригодных для использования в качестве адъювантов в составе изобретение включает N-ацетил-мурамил-L-треонил-D-изоглутамин (thr-MDP), N-ацетил-нормурамил-L-аланил-D-изоглутамин (nor-MDP), и N-ацетилмурамил-L-аланил-D-изоглутаминил-L-аланин-2-(1' - 2' - дипальмитоил-s- n-глицеро-3-гидроксифосфорилокси) - этиламин MTP-PE).

Соединения Имидазохинолона L.

[0893] примеры соединений имидазохинолона, пригодных для применения адъювантов в изобретение входят Имиквамод и его гомологи, описанные далее in Stanley, " Имиквимод и имидазохинолоны: механизм действия и терапевтический потенциал " Clin Exp Dermatol (2002) 27(7): 571-577 and Jones, "Рескимод 3М", Cutg (2003) 4(2):214-218

М. виросомы и вирусоподобные частицы (VLPs)

[0894] виросомы и вирусоподобные частицы (VLPs) также могут использоваться в качестве адъюванты в изобретении. Эти структуры обычно содержат один или больше протеинов от вируса выборочно совмещенного или сформулированного с а фосфолипидный. Они вообще непатогенные, не-копирующая и вообще не содержат ни одного из нативных вирусных геномов. Вирусная белки могут быть рекомбинантно получены или выделены из целых вирусов. Эти вирусные белки, пригодные для использования в виросомах или VLPs включают белки, полученные из вируса гриппа (такие как HA или NA), гепатита В вирус (как протеины ядра или капсида), вирус гепатита Е, корь вирус, Синдбис-вирус, ротавирус, вирус ящура, Ретровирус, вирус Норуолка, вирус папилломы человека, ВИЧ, РНК-фаги, В. бета.-фаг (например, белки оболочки), га-фаг, фр-фаг, фаг AP205, и Ту (как протеин Р1 retrotansposon Ту). Обсуждаются VLPs далее в WO 03/024480, WO 03/024481 и Niukura et al., "Химерный Рекомбинантные вирусоподобные частицы гепатита Е в качестве носителя оральной вакцины Представление чужеродных эпитопов", Вирусология (2002) 293:273-280; Lenz et al., "Папилломароподобные частицы индуцируют острую активацию дендритных клеток Клетки", журнал иммунологии (2001) 5246-5355; Pinto, et al., "Клеточный Иммунные реакции на вирус папилломы человека (ВПЧ)-16 L1 здоровых добровольцев Иммунизированный рекомбинантными Вирусоподобными частицами HPV-16 L1", журнал Инфекционные заболевания (2003) 188:327-338; и Гербер и др., "Человек Вирусоподобные частицы папилломавируса являются эффективными оральными иммуногенами, когда Совместно с Escherichia coli Термолабильный Энтероксин мутант R192G или CrG", журнал вирусологии (2001) 75(10):4752-4760. Виросомы являются обсуждается далее В, например, Gluck et al., "новая технология Платформы в разработке вакцин для будущего", вакцинация (2002 год) 20:B10-B16.

[0895] изобретение может также содержать комбинации аспектов одного или нескольких больше из адъювантов идентифицировано выше. Например, следующее адъювантные композиции могут быть использованы в изобретении:

[0896] (1) сапонин и эмульсия масло-в-воде (WO99 / 11241);

[0897] (2) сапонин (например, QS21)+нетоксичное производное ЛПС (например, 3dMPL) (см. WO 94/00153);

[0898] (3) сапонин (например, QS21)+нетоксичное производное ЛПС (например, 3dMPL) + холестерин а;

[0899] (4) сапонин (например, QS21)+3dMPL+IL-12 (необязательно + стерол) (WO98 / 57659);

[0900] (5) комбинации 3dMPL с, например, QS21 и/или эмульсии масло-в-воде (см. Европейские патентные заявки 0835318, 0735898 и 0761231);

[0901] (6) SAF, содержащий 10% сквалана, 0,4% Твина 80, 5% плуороник-блока полимер L121, а также thr-MDP, либо микрофлюидизированный в Субмикрон эмульсия или vortexed для того чтобы произвести эмульсию более большого размера частицы.

[0902] (7) Ribi.TM. адъювантная система (RAS), (Ribi Immunochem) содержащая 2% сквалан, 0,2% твин 80, и одна или больше бактериальная клеточная стенка компоненты из группы, состоящей из монофосфолипиды а (MPL), димиколат трегалозы (TDM) и скелет клеточной стенки (CWS), предпочтительно MPL+CWS (Detox.TM.); и

[0903] (8) одна или несколько минеральных солей (таких как соль алюминия)+а нетоксичное производное ЛПС (например, 3dPML).

[0904] соли алюминия и MF59 являются предпочтительными адъювантами для парентерального введения иммунизация. Мутантные бактериальные токсины являются предпочтительными слизистыми адъювантами.

[0905] как указано выше, адъюванты пригодны для применения в изобретении может также включать одно или несколько из следующих действий:

[0906] E. coli термолабильный энтеротоксин ("LT"), или детоксифицированные мутанты таких как мутанты K63 или R72;

[0907] токсин холеры ("КТ") или его детоксифицированные мутанты;

[0908] микрочастицы (т. е. частица .о нас.100 Нм к.о нас.150 . мн. м в диаметре, более предпочтительно .о нас.200 Нм к.о нас.30. мн. м in диаметр ,и наиболее предпочтительно 500 Нм к.о нас.10.мн. м в диаметре) образуется из биоразлагаемых и нетоксичных материалов (например а полиэстер(.альфа.-гидроксикислота), полигидроксимасляная кислота, полиортоэфир, полиангидрид, поликапролактон и др.);

[0909] полиоксиэтиленовый эфир или полиоксиэтиленовый эфир (см. Международная патентная заявка WO 99/52549);

- [0910] поверхностно-активное вещество сложного полиоксиэтиленсорбитана в комбинации с Ан октоксинол (см. международную патентную заявку WO 01/21207) или а полиоксиэтиленалкиловый эфир или сложноэфирное поверхностно-активное вещество в комбинации с Ат по крайней мере одно дополнительное неионное поверхностно-активное вещество, такое как октоксинол (см. Международная патентная заявка WO 01/21152);
- [0911] хитозан (например, Международная патентная заявка WO 99/27960)
- [0912] иммуностимулирующий олигонуклеотид (например, CpG-олигонуклеотид) а также сапонин (см. международную патентную заявку WO 00/62800)
- [0913] иммуностимулирующая двухцепочечная РНК.
- [0914] соединения алюминия (например, гидроксид алюминия, фосфат алюминия, гидроксифосфат алюминия, оксигидроксид, ортофосфат, сульфат и др. (например, см. главы 8 и 9 проекта вакцины: субъединица и адъювант так точно, ЭДС. Powell & Newman, Plenum Press 1995 (ISBN 0-306-44867-X) (далее "конструкция вакцины"), или смеси различного алюминия соединения, причем соединения принимают любую подходящую форму (например, гель, кристаллический, аморфный etc.), и с предпочтительной адсорбцией;
- [0915] MF59 (5% сквален, 0,5% твин 80 и 0,5% Span 85, сформулированный в субмикронные частицы с использованием микрофлюидизатора) (см. Главу 10 из Дизайн вакцины; Смотрите также международную патентную заявку WO 90/14837);
- [0916] липосомы (см. главы 13 и 14 проекта вакцины);
- [0917] ISCOMs (см. Главу 23 проекта вакцины);
- [0918] SAF, содержащий 10% сквалана, 0,4% Твина 80, 5% плуороник-блока полимер L121, а также thr-MDP, либо микрофлюидизированный в Субмикрон эмульсия или vortexed для того чтобы произвести эмульсию более большого размера частицы (см. Глава 12 о разработке вакцины);
- [0919] Ribit.M. адъювантная система (RAS), (Ribi Immunochem) содержащая 2% Сквален, 0,2% Tween 80 и один или более компонентов бактериальной клеточной стенки из группы, состоящей из монофосфолипид а (МПЛ), трегалозы димиколят (TDM) и скелет клеточной стенки (CWS), предпочтительно MPL+CWS (Detox.M-да.);
- [0920] адъюванты сапонина, такие как QuilA или QS21 (см. Главу 22 из Дизайн вакцины), также известный как Stimulon.M-да.;
- [0921] ISCOMs, который может быть лишен дополнительного моющего средства (WO 00/07621);
- [0922] полный адъювант Фрейнда (CFA) и неполный адъювант Фрейнда (MPC);
- [0923] цитокины, такие как интерлейкины (например, IL - 1, IL-2, IL-4, IL-5, ИЛ-6, Ил-7, Ил-12 и др.), интерфероны (например, интерферон-гамма.), макрофагальный колониестимулирующий фактор, фактор некроза опухоли и др. (видеть Главы 27 и 28 проекта вакцины);
- [0924] монофосфорил липид а (MPL) или 3-О-деацелированный MPL (3dMPL) (например Глава 21 о разработке вакцины);
- [0925] комбинации 3dMPL с, например, QS21 и / или масло-в-воде эмульсии (заявки на европейские патенты 0835318, 0735898 и 0761231);
- [0926] олигонуклеотиды, содержащие CpG-мотивы (см. вакцину Крига (2000) , 19:618-622; Krieg (2001) Curt. ОПИН. Моль. Ther., 2001, 3: 15-24; WO 96/02555, WO 98/16247, WO 98/18810, WO 98/40100, WO 98/55495, WO 98/37919 и WO 98/52581, etc.) т. е. содержащий по меньшей мере один динуклеотид CG,
- [0927] полиоксиэтиленовый эфир или полиоксиэтиленовый эфир (Международный заявка на патент WO99 / 52549);
- [0928] поверхностно-активное вещество сложного полиоксиэтиленсорбитана в комбинации с Ан октоксинол (Международная патентная заявка WO 01/21207) или А полиоксиэтиленалкиловый эфир или сложноэфирное поверхностно-активное вещество в комбинации с Ат по крайней мере одно дополнительное неионное поверхностно-активное вещество, такое как октоксинол (WO 01/21152);
- [0929] иммуностимулирующий олигонуклеотид (например, CpG-олигонуклеотид) и сапонин (WO00 / 62800);
- [0930] иммуностимулятор и частица соли металла (Международная заявка на патент WO00 / 23105);
- [0931] а сапонин и эмульсия масло-в-воде (WO 99/11241);
- [0932] а сапонин (например, QS21)+3dMPL+IL-12 (необязательно + а стерол) (WO 98/57659).
- [0933] другие адъюванты, пригодные для мукозального или парентерального введения также доступны (например см. Главу 7 дизайна вакцины: субъединица и адъювантный подход, ред. Powell & Newman, Plenum Press 1995 (ISBN 0-306-44867-X).
- [0934] мутанты ЛТ являются предпочтительными слизистыми адъювантами, в частности Мутанты" K63 "и" R72 " (например, см. международную патентную заявку WO 98/18928), в результате чего усиливается иммунный ответ.
- [0935] микрочастицы также являются предпочтительными слизистыми адъювантами. Это предпочтительно полученные из Поли (а-гидроксикислоты), в частности из а Поли (лактид) ("PLA"), сополимер D, L-лактида и гликолида или гликолевая кислота, такая как Поли (D, L-лактид-со-гликолид) ("PLG" или "PLGA"), или сополимер D, L-лактида и капролактона. То микрочастицы могут быть получены из любого из различных полимерных исходных материалов материалы которые имеют разнообразие молекулярные веса и, в случае сополимеры как ПЛГ, разнообразие лактид:коэффициенты гликолида, выбор которых будет во многом зависеть от выбора, в частности о совместном использовании антигена.
- [0936] вирус торс (инактивированный или аттенуированный), вирусные антигены, антитела или адъюванты данного изобретения могут быть захвачены внутри микрочастицы, или могут быть адсорбированы к ним. Захват в пределах PLG микрочастицы предпочтительнее. Микрочастицы ПЛГ обсуждаются в дальнейшем подробно в Morris et al., (1994), вакцина, 12: 5-11, в главе 13 из Мукозальные вакцины, ред. Kiyono et al., Academic Press 1996 (ISBN 012410587), а также в главах 16 и 18 проекта вакцины: субъединица и адъювантный подход, ред. Powell & Newman, Plenum Press 1995 (ISBN 0-306-44867-X).
- [0937] LT мутанты могут преимущественно использоваться в комбинации с микрочастиц-захваченный антиген, приводящ к в значительно увеличенном иммунный ответ.
- [0938] соединения алюминия и MF59 являются предпочтительными адъювантами для парентеральное применение.
- [0939] в состав может входить антибиотик.
- [0940] могут быть введены иммуногенные композиции по изобретению в разовой дозе или в составе режима введения. Режим может измениться

включают в себя грунтовочные и форсирующие дозы, которые могут вводиться слизисто, парентерально или в различных их сочетаниях.

[0941] способы осуществления изобретения дополнительно включают обработку или предотвращение заболевания, связанного с вирусом торс, путем введения животному а композиции, содержащая эффективное количество антител типа изобретение. "Эффективным количеством" антител данного изобретения является сумма, достаточная для обеспечения пассивной иммунизационной защиты или лечения - к животному. Предпочтительно антитела данного изобретения являются специфическими к вирусному антигену ОРВИ.

[0942] способы лечения могут сочетать в себе как иммуногенные композиции, так и композиции антител. Соответственно изобретение содержит способ для лечение или профилактика заболевания, связанного с вирусом торс, содержащего введение иммуногенной композиции, содержащей иммунологически эффективное количество вирусного антигена атипичной пневмонии и введение эффективного антигена вируса ОРВИ количество антител, специфичных к вирусному антигену ОРВИ. Иммуногенный фактор композиция и антитела могут быть введены совместно или отдельно. Изобретение дополнительно содержит композицию, содержащую иммуногенная композиция, содержащая иммунологически эффективное количество а вирусный антиген атипичной пневмонии и дополнительно содержащий эффективное количество антитела, специфичные к вирусному антигену ОРВИ.

[0943] вирусные антигены и антитела к ОРВИ по изобретению также могут быть обнаружены в организме человека. следует вводить в полинуклеотидной форме. Вирусные антигены атипичной пневмонии и / или белки антитела затем экспрессируются *in vivo*.

[0944] вирусные антигены атипичной пневмонии и антитела по изобретению могут также поставьте используя одни или больше векторы гена, управляемые через иммунизация нуклеиновыми кислотами или тому подобное с использованием стандартной доставки генов протоколы. Способы доставки генов известны в искусстве. См., например, Американский Пат. № 5 399 346, 5 580 859, 5 589 466. Конструкции могут быть: доставляется (например, вводится) либо подкожно, эпидермально, внутривенно, внутримышечно, внутривенно, слизисто (например, назально, ректально и вагинально), внутривенно, устно или комбинации из этого. Внутримышечное введение 25. μ g плазмидной ДНК, кодирующей Спайк антигена, в 200. μ l PBS pH 7,4, на неделях 0, 3 и 6, были описано для мышей Yang et al. (2004) Nature 428:561-564.

[0945] образцовое средство доставки генов с недостаточной репликацией, которое может быть использованным в практике настоящего изобретения является любой из альфовирусов векторы, описанные, например, в U. S. Pat. № 6342372; 6329201 и международное издание WO 01/92552.

[0946] был разработан ряд вирусных систем на основе гена перенос в клетки млекопитающих. Например, ретровирусы обеспечивают а удобная платформа для систем доставки генов. Выбранные последовательности могут быть вставляются в вектор и упаковывается в ретровирусные частицы с использованием приемы, известные в искусстве. Затем можно выделить рекомбинантный вирус и доставляется в клетки субъекта либо *in vivo*, либо *ex vivo*. Ряд были описаны ретровирусные системы (U. S. Pat. No. 5.219.740; Miller & Rosman, BioTechniques (1989) 7:980-990; Miller, A. D., Human Генная терапия (1990) 1:5-14; Scarpa et al., Вирусология (1991) 180:849-852; Бернс и др., Процесс. Натл. Акад. Sci. США (1993) 90: 8033-8037; и Борис-Lawrie & Temin, Cur. ОПИН. Жене. Развивать. (1993) 3:102-109.

[0947] также был описан ряд аденовирусных векторов. В отличие от ретровирусы, которые интегрируются в геном хозяина, аденовирусы сохраняются экстрахромосомально, что позволяет минимизировать риски, связанные с inserцией мутагенез (Хадж-Ахмад и Грэм, Дж. (1986) 57:267-274; Bett et Аль., J. Virol. (1988) 67:5911-5921; Mittereder et al., Генная Терапия Человека (1994)5:717-729; set и др., J. Virol. (1994) 68:933-940; Barr et al., Генная Терапия (1994) 1: 51-58; Berkner, K. L. BioTechniques (1988) 6: 616-629; и Рич и др., Генная Терапия Человека (1993) 4:461-476). Аденовирусная доставка кодон-оптимизированных вариантов генов, кодирующих SARS Спайк S1 антигенов коронавируса структурный, протеин мембраны и белок нуклеокапсида был исследован у макак-резусов и найден чтобы вызвать сильную нейтрализующую реакцию антител (Gao et al. (2003) Ланцет 362 (9399):1895-1896).

[0948] кроме того, различные адено-ассоциированные вирусные (AAV) векторные системы были разработаны для доставки генов. Векторы AAV могут быть легко доступны построены с использованием методов, хорошо известных в искусстве. Смотрите, например, US Pat. № 5,173,414 и 5,139,941; Международная публикация № WO 92/01070 (опубликовано 23 янв. 1992) и WO 93/03769 (опубликовано 4 марта. 1993); Лебковский и др.- Молек. Клетка. БИОЛЬ. (1988) 8:3988-3996; Vincent et al., Вакцины 90 (1990) (Cold Spring Harbor Laboratory Press); Carter, B. J. Современное мнение в области биотехнологии (1992) 3: 533-539; Muzyczka, N. Current Темы в Microbiol. и Иммунол тоже. (1992) 158: 97-129; Котин, Р. М. Человек Генная терапия (1994) 5:793-801; Шеллинг и Смит, генная терапия (1994) 1:165-169; и Чжоу и др., J. Exp. Медицинский. (1994) 179:1867-1875.

[0949] еще одна векторная система, полезная для доставки полинуклеотидов, мукосалли и в противном случае, энтерально управляемый рекомбинантный вакцины против оспы, описанные Small, Jr., P. A. и др. (U. S. Pat. Нет. 5,676,950, выпущено в октябре. 14, 1997, здесь включены по ссылке) как а также вакцинный вирус и птичьей оспы. В качестве примера, рекомбинанты вируса осповакцины, экспрессирующие эти гены, можно построить в виде следует. ДНК, кодирующая антиген SARS или антитело, или кодирующее антитело последовательности сначала вставляется в соответствующий вектор так, чтобы она была примыкающие к промотору вакцины и фланкирующие последовательности ДНК vaccinia, такие как в качестве последовательности, кодирующей тимидинкиназу (ТК). Затем используется этот вектор для трансфекции клеток, которые одновременно инфицированы вакцинами. Гомологичная рекомбинация служит для того чтобы ввести промотор vaccinia плюс ген, кодирующий интересующие кодирующие последовательности в вирусном геноме. То полученное Т3.отхлебывать.- рекомбинантный можно выбрать путем культивировать клетки внутри наличие 5-бромдезоксисуридина и подбор вирусных бляшек резистентных к этому.

[0950] альтернативно, авиопоксвирусы, такие как ветряная оспа и сапагурохи вирусы, также могут быть использованы для доставки генов, кодирующих вирус SARS антигены или антитела данного изобретения. Рекомбинантные вирусы авирох, экспрессирующие иммуногены из патогенов млекопитающих, как известно, наделяют защитный иммунитет при введении не-птичьим видам. Использование Ан вектор авирох особенно желателен в человеке и другом млекопитающем виды, так как члены рода авирох могут только продуктивно размножаться у восприимчивых видов птиц и поэтому не являются инфекционными у млекопитающих яички. Способы получения рекомбинантных авиопоксвирусов известны в США искусство и применение генетической рекомбинации, как описано выше в отношении производство вакцинных вирусов. См., например, WO 91/12882; WO 89/03429; и WO 92/03545. Можно также использовать векторы, полученные из пикорнавируса. (Видеть, например, американский Пат. № 5,614,413 и 6,063,384).

[0951] молекулярные конъюгированные векторы, такие как химерный аденовирус векторы, описанные в Michael et al., J. Biol. Хим.. (1993) 268:6866-6869 а также Вагнер и др., Процесс. Натл. Акад. Sci. США (1992) 89:6099-6103, может также используйте для доставки генов.

[0952] система инфекции/трансфекции на основе вакцины может быть удобно используется для обеспечения индуцибельного, переходного выражения кодирования последовательности, представляющие интерес (например, вирусный антиген SARS или антитело кассета экспрессии) в клетке хозяина. В этой системе клетки являются первыми заражен *in vitro* рекомбинантным вирусом vaccinia, который кодирует бактериофаг Т7 РНК-полимераза. Эта полимеразы отображает изысканный специфика в том, что он только транскрибирует шаблоны, несущие промоторы Т7. После заражения клетки трансфицируются с помощью полинуклеотида интерес, движимый промотором Т7. Полимераза, выраженная в виде цитоплазма из вируса осповакцины рекомбинантно транскрибирует трансфицированный препарат ДНК в РНК, которая затем переводится в белок хозяином трансляционная техника. Метод обеспечивает высокий уровень, переходный процесс, цитоплазматическая продукция больших количеств РНК и ее перевод продукты. Смотрите, например, Elroy-Stein and Moss, Proc. Натл. Акад. Sci. США (1990) 87:6743-6747; Fuerst et al., Процесс. Натл. Акад. Sci. США (1986 год) 83:8122-8126.

[0953] как альтернативный подход к заражению вакцинами или авиопоксом рекомбинанты вируса, или к поставке генов используя другое вирусное векторы, система усиления могут быть использованы, что приведет к высокому уровню экспрессия после введения в клетки хозяина. В частности, РНК Т7 промотор полимеразы, предшествующий кодирующей области для Т7 РНК-полимеразы, может будте спроектированы. Перевод РНК, полученной из этого шаблона будет генерируйте РНК-полимеразу Т7, которая в свою очередь будет транскрибировать больше шаблона. Одновременно будет существовать кднк, экспрессия которой находится под контролем из промотора Т7. Таким образом, некоторая часть полимеразы РНК Т7 произведенной от перевод шаблона амплификации РНК приведет к транскрипции о желаемом гене. Потому что некоторая полимеразы РНК Т7 необходима к начните амплификацию, полимеразу РНК Т7 сможете быть введено в клетки вместе с шаблоном(ами) для того чтобы воспаленный реакцию транскрипции. То полимеразу можно вводить в виде белка или на плазмиде, кодирующей РНК-полимераза. Для дальнейшего обсуждения систем Т7 и их использования для трансформирующие клетки, см., например, Международная публикация No. WO 94/26911; Studier and Moffatt, J. Mol. БИОЛЬ. (1986) 189: 113-130; Дэн и

Вольф, Gene (1994) 143:245-249; Gao et al., Биохимия. Биофизика. Рес. Коммуна. (1994) 200:1201-1206; Gao and Huang, Nuc. Acids Res. (1993) 21: 2867-2872; Chen et al.- НУК. Acids Res. (1994) 22:2114-2120; и США Пат. Нет. 5,135,855.

[0954] иммуногенные композиции изобретения могут дополнительно содержать разбавители, такие как вода, физиологический раствор, глицерин, этанол и др. Дополнительно, вспомогательные вещества, такие как смачивающие или эмульгирующие агенты, рН-буферизация вещества и тому подобное могут быть включены в иммуногенный состав.

[0955] иммуногенные композиции, используемые в изобретении, могут быть: вводится животному. Животные, пригодные для использования в методах изобретения относятся к людям и другим приматам, в том числе нечеловеческим приматам как шимпанзе, и другие виды обезьян и обезьяны; сельскохозяйственные животные такие как скотины, овцы, свиньи, козы и лошади, домашние животные как собаки и коты; лабораторные животные включая грызунов как мыши, крысы и морские свинки; птицы, включая домашних, диких и охотничьих птиц, таких как цыплята, индюшки и другие галлиновые птицы, утки, гуси и другие виды птиц. Нравится. Животные, пригодные для использования в изобретении, могут быть любого возраста, включая как взрослых, так и новорожденных. Трансгенных животных можно также использовать внутри изобретения.

[0956] иммуногенные композиции по изобретению могут быть использованы для лечения или предотвратить заболевания, связанные с вирусом атипичной пневмонии.

[0957] композиции по изобретению предпочтительно фармацевтически приемлемо и фармакологически приемлемо. В частности, в том, что композиции предпочтительно не являются биологически или иным образом нежелательными, т. е., материал может быть управлен к индивидуалу в образовании или состав без причинения каких-либо нежелательных биологических эффектов или взаимодействие в вредоносной манере с любым из компонентов системы состав, в котором он содержится.

[0958] фармацевтически приемлемые соли могут быть также использованы в композициях изобретения, например, минеральных солей типа гидрохлоридов, гидробромиды, фосфаты или сульфаты, а также соли органических кислот такие как ацетаты, проприонаты, малонаты или бензоаты. Особенно полезными белковыми субстратами являются сыровяточные альбумины, замочная скважина lampet гемоцианин, молекулы иммуноглобулина, тиреоглобулин, овальбумин, столбнячный анатоксин, а также другие белки хорошо известны тем, кто обладает мастерством в этом искусстве. Композиции из изобретения может также содержать жидкости или вспомогательные вещества, такие как вода, физиологический раствор, глицерин, декстроза, этанол или им подобные, отдельно или внутри комбинация, а также вещества, такие как смачивающие агенты, эмульгирующие агенты, или агенты буферизации рН. Липосомы также могут быть использованы в качестве носителя для композиции изобретения.

[0959] специфические реагенты и аналитические анализы SARS могут быть использованы в производство и испытания вакцин данного изобретения. Такой аналитик анализы включают в себя, например: 1) титрование вирусов и анализы бляшек для количественное определение инфекционных вирусных частиц, 2) анализ нейтрализации при постоянном вирусе и варьировании разведений сыворотки, 3) двухэтапная РТ-ПЦР система (световой Циклер-Roche) для обнаружения РНК вируса негативной пряди, при последовательность цели расположенная внутри ген N, обеспечивая самое высокое возможная чувствительность, и 4) анализы ELISA и western blot для обнаружения и квалификация вирусных белков.

[0960] кроме того, была произведена антисыворотка кролика поликлональная к получить антителные реагенты (и продемонстрировать индукцию нейтрализации антитела) против ОРВИ-ков. Пример протокола для генерации таких реагенты изложены ниже. Вирус сначала культивируется в подходящих условиях культура клеток, таких как клетки Vero, и гранулированные через 20% сахарозы (w/v) подушка. Затем гранула подвергается воздействию глицерина градиент калия-тартрата для дальнейшей очистки. То вирусодержащая фракция затем разбавляется и гранулируется с помощью ультрацентрифугирование. Затем гранула растворяется в PBS и вирус является инактивирован с C. sub.3 ч. sub.4о. sub.2 (бета-пропиолактон, БПЛ). Два кроликов иммунизируют подкожно (СК) на 0, 14 и 2 день 8 с помощью 1.раз.10.отхлебывать.9 инактивированных вирусных частиц, смешанных с ИФА в качестве адьюванта. Кролики кровоточат в дни 0 (р, повторная прививка), 13, 28 и 35 (1 неделя после 3-й иммунизации). Сыворотки, полученные по этому протоколу, были протестированы на наличие их реактивность против протеинов SARS-CoV в западных кляксах и найденный к реагируют с основными структурными белками Спайк (S), мембрана (M) и нуклеокаспид (N).

J. Новые Коронавирусные Вакцины

[0961] эпидемия торс привела к повышению осведомленности о вирусных инфекциях инфекции, вызванные коронавирусами. Вакцинами изобретения могут быть: адаптированы для профилактики или лечения возникающих штаммов коронавируса, в том числе появляются штаммы вируса ОРВИ.

[0962] изобретение обеспечивает вакцину, содержащую инактивированный (или убитый) человеческий коронавирус, ослабленный человеческий коронавирус, расщепленный человек препарат коронавируса, или рекомбинантный или очищенный субъединичный состав одного или нескольких антигенов из коронавируса человека, в котором участвует человек коронавирус-это не коронавирус ОРВИ. По желанию, человек коронавирус не является коронавирусом 229E. По желанию, человек коронавирус не является коронавирусом OC43. По желанию, человек коронавирус не является коронавирусом NL63. Таким образом, изобретение обеспечивает вакцина, как определено выше, в которой человеческий коронавирус не является торс коронавирус, нет коронавируса 229E, нет коронавируса OC43 и это не коронавирус NL63. Такие вакцины полезны для профилактики и / или лечение возникающих у человека коронавирусных инфекций.

[0963] изобретение также обеспечивает вакцину, содержащую: (а) Ан инактивированный (или убитый) человеческий коронавирус, ослабленный человек коронавирус, разделенный человеческий препарат коронавируса, или рекомбинантный или очищенная субъединичная композиция одного или нескольких антигенов из человека коронавирус, при котором коронавирус человека не является коронавирусом ОРВИ, как определено выше; и (б) инактивированный (или убитый) коронавирус человека, аттенуированный человеческий коронавирус, препарат расщепленного человеческого коронавируса, или рекомбинантный или очищенный субъединичный состав одного или нескольких антигенов от коронавируса человека, где коронавирус человека-это торс коронавирус. Такие вакцины полезны для профилактики и/или лечения обоих заболеваний Торс и другие коронавирусы человека.

[0964] а также предоставление вакцин, содержащих антигены от более чем один тип коронавируса, изобретение также предусматривает вакцины, содержащие антигены из более чем одного штамма одного и того же коронавируса, например различных штаммы коронавируса SARS, или различные штаммы коронавируса кроме коронавируса атипичной пневмонии. В одном варианте осуществления вакцина содержит антигены по меньшей мере двух штаммов коронавируса или по меньшей мере трех штаммы коронавируса. В одном варианте осуществления вакцина содержит антигены по крайней мере, от двух типов коронавируса. В одном варианте осуществления, вакцина содержит по меньшей мере один антиген из каждого из известных типов коронавирусы (тип I, тип II и тип III). Такие вакцины следуют за модель современных вакцин против гриппа.

[0965] отбор коронавирусов и / или штаммов коронавирусов для использования в основе вакцин данного изобретения могут лежать различные критерии. Для например, выбор может быть основан на вирусах и / или штаммах, которые были обнаружен в географическом регионе (например, северный или Южный полушария, конкретной страны и т.д.) куда направлена вакцина. Отбор может быть основан на результатах наблюдения за животными, например: вирус, обнаруженные в популяциях кошек. Выбор может быть основан на следующем: результаты клинического наблюдения, например, за вирусами, обнаруженными у пациентов госпитализирован с респираторной инфекцией. Выбор может быть выполнен каждый год, например, до наступления зимы. Вакцины также могут вводиться ежегодно, опять же по образцу нынешних вакцин против гриппа.

[0966] предпочтительные вакцины являются достаточно иммуногенными, чтобы обеспечить а нейтрализующий иммунный ответ, и более предпочтительно защитный и / или терапевтический иммунный ответ. Особо предпочтительные вакцины отвечают требования к эффективности, которые могут время от времени уточняться ВОЗ.

[0967] а предпочтительный субъединичный антиген для включения в вакцины группы изобретения представляет собой очищенный спайковый белок, предпочтительно в олигомерной форме (например, тримерическая) форма. Спайк-белок может быть или мой не расщепляется, например в свои продукты S1 и S2.

[0968] методы, описанные выше для отбора вирусов и/или штаммы для производства вакцин также могут быть использованы для подбора подходящих вирусы и / или штаммы, из которых могут быть получены последовательности HR1 и HR2 для обеспечения терапевтических пептидов, как описано выше.

III. диагностические композиции и способы осуществления изобретения

[0969] изобретение обеспечивает способы обнаружения коронавируса SARS. Обнаружение в терпеливейших образцах можно использовать для того чтобы обнаружить и диагностировать заражение вирусом. Обнаружение в донорской крови можно использовать к предотвращению непреднамеренной передачи вируса во время трансплантации крови процедуры методы обнаружения делятся на три основные категории: обнаружение нуклеиновых кислот вируса атипичной пневмонии; обнаружение белков вируса атипичной пневмонии; и выявление иммунных реакций против вируса ОРВИ. Изобретение обеспечивает все такой метод.

[0970] как использовано здесь ссылаясь на последовательности нуклеотида, в частности, олигонуклеотидные зонды и праймеры," похожие " последовательности включает в себя те последовательности, которые по крайней мере на 90% идентичны известным SARSV геномная последовательность и включает последовательности, которые по меньшей мере на 95% идентичны, по крайней мере, 99% идентичны и 100% идентичны с геномной последовательностью SARSV над длиной зонда или праймера.

[0971] как использовано здесь, термина "регион нуклеиновой кислоты цели" или "цель нуклеиновая кислота" обозначает молекулу нуклеиновой кислоты с "целевой последовательностью" до будтье усилены. Целевая нуклеиновая кислота может быть либо одноцепочечной, либо одноцепочечной. двухцепочечный и может включать в себя другие последовательности, кроме целевой последовательности, которая не может быть усилена. Термин "целевая последовательность" относится к определенной нуклеотидной последовательности целевой нуклеиновой кислоты, которая является чтобы быть усиленным. Целевая последовательность может включать в себя зонд-гибридизацию область, содержащаяся в молекуле-мишени, с которой образуется зонд стабильный гибрид при требуемых условиях. "Целевая последовательность" может также включают комплексообразующие последовательности, к которым относятся олигонуклеотидные праймеры комплекс и быть расширены с использованием целевой последовательности в качестве шаблона. Где нуклеиновая кислота цели первоначально одноцепочечна, термина "цель последовательность" также относится к последовательности, дополняющей "цель последовательность" как присутствует в целевой нуклеиновой кислоте. Если "цель нуклеиновая кислота" первоначально двухцепочечна, термин "целевая последовательность" относится к как плюс (+), так и минус (-) пряди.

[0972] термин "праймер" или "олигонуклеотидный праймер", используемый здесь, относится к олигонуклеотиду, который действует, чтобы инициировать синтез а комплементарная нить ДНК при помещении в условия, в которых синтез продукта расширения праймера индуцируется т. е. в присутствии нуклеотида и индуцирующий полимеризацию агент, такой как ДНК или РНК полимеразы и на соответствующих температуре, ПЭ-аш, концентрации металла, и соли сосредоточенность. Праймер предпочтительно одно-сел на мель для максимума эффективность в усилении, но может альтернативно быть двухцепочечна. Если двухцепочечный грунт сначала обрабатывают для отделения его прядей прежде чем быть использованным для подготовки продуктов расширения. Эта стадия денатурации типично произведено эффект жарой, но может альтернативно быть унесено используя щелочь с последующей нейтрализацией. Таким образом, "праймер" является комплементарным к шаблон, а также комплексы путем водородной связи или гибридации с шаблон для получения праймера / шаблонного комплекса для инициирования синтеза путем а полимеразы, которая расширяется за счет добавления ковалентно связанной основания, связанные на его 3' конце, дополняющие шаблон в этом процессе о синтезе ДНК.

[0973] как использовано здесь, термина "зонд" или "зонд олигонуклеотида" ссылается к структуре, состоящей из полинуклеотида, как определено выше, что содержит последовательность нуклеиновых кислот, комплементарную последовательности нуклеиновых кислот присутствует в мишени Анализ нуклеиновой кислоты. Полинуклеотидные области зонды могут состоять из ДНК, и/или РНК, и / или синтетического нуклеотида аналоги. Когда "зонд олигонуклеотида" быть использованным в 5' нуклеаза assay, как то TaqMan.TM. метод, зонд будет содержать по крайней мере один флуоресцер и по крайней мере один Гаситель, который переваривается 5' эндонуклеазная активность полимеразы, используемой в реакции, чтобы обнаружить любые амплифицированные целевые олигонуклеотидные последовательности. В этом контексте, олигонуклеотидный зонд будет иметь достаточное количество фосфодиэфиров связи, прилегающие к его 5' конец так, что 5' до 3' нуклеазная активность использованный сможет эффективно ухуждать связанный зонд для того чтобы отделить флуоресцентные лампы и гасители. Когда зонд олигонуклеотида использован в Техника ТМА, она будет соответствующим образом помечена, как описано ниже.

[0974] будет оценено, что гибридирующие последовательности не нуждаются имейте совершенную комплементарность для того чтобы обеспечить стабилизированные гибриды. Во многом ситуации, стабильные гибриды будут формироваться там, где меньше чем около 10% от общего числа гибридов. основания-это несовпадения, игнорирующие петли из четырех или более нуклеотидов. Соответственно, используемый здесь термин "комплементарный" означает олигонуклеотид, который образует стабильный дуплекс со своим "комплементом" под условия анализа, как правило, где есть около 90% или более гомологии.

[0975] термины "гибридизация" и "гибридизация" относятся к образованию комплексов между нуклеотидными последовательностями, которые достаточно комплементарно для того чтобы сформировать комплексы через спаривать основания Watson-Crick. Где а праймер "гибридизирует" с мишенью (шаблоном), такими комплексами (или гибридами) являются достаточно стабильными для выполнения функции заправки, требуемой, например ДНК-полимеразы для инициации синтеза ДНК.

[0976] жесткие условия гибридации обычно включают соль концентрации меньше чем около 1 м, более обычно меньше чем около 500 мм и предпочтительно меньше чем около 200 мм. температуры гибридации могут будтье так же низко, как 5.степень. С., Но обычно больше, чем 22.степень. С., как правило, больше, чем около 30.степень. С., и предпочтительно в избытке примерно 37 человек.степень. С. Более длинные фрагменты могут потребовать более высокой гибридации температуры для специфической гибридации. Другие факторы могут повлиять на строгость гибридации, включающая композиция основы и длину комплементарные пряди, наличие органических растворителей и степень использования основы несоответствие, и комбинация используемых параметров является более важным чем абсолютная мера любого отдельно взятого человека. Другая гибридизация условия которые могут быть проконтролированы включают тип и концентрацию буфера, рН раствора, наличие и концентрация блокирующих реагентов для снижения фоновое связывание, такое как повторяющиеся последовательности или блокирующий белок растворы, моющие средства типа (ов) и концентрации, молекулы, такие как полимеры которые увеличивают относительную концентрацию полинуклеотида, Ион(ы) металла и их концентрация(ы), хелатор(ы) и их концентрации и другие условия известны в искусстве. Меньше используются жесткие и / или более физиологичные условия гибридации где Меченый продукт амплификации полинуклеотида циклически включается и выключается а субстрат, связанный с комплементарным зондовым полинуклеотидом в течение а в реальном масштабе времени assay который проконтролирован во время амплификации ПКР как а молекулярный анализ маяка. Такие менее жесткие условия гибридации могут также включают условия разрешения эффективные для других аспектов метод, например обратная транскрипция или ПЦР.

[0977] как использовано здесь, "биологический образец" ссылается к образцу ткань, клетки или жидкость, выделенные из объекта, который обычно включает в себя антитела, вырабатываемые субъектом. Типичные образцы включают но нет ограниченный к, кровь, плазма, сыворотка, фекальное дело, моча, костный мозг, желчь, спинномозговая жидкость, лимфатическая жидкость, образцы кожи, выделения из кожи, дыхательные, кишечные и мочеполовые пути, слезы, слюна, мокрота, слизистые, молоко, клетки крови, органы, ткани, биопсии (например, легких, печени, почки), а также образцы компонентов клеточной культуры in vitro, в том числе но не ограничиваясь кондиционированными средами, образующимися в результате роста клеток и ткани в культуральной среде, например рекомбинантные клетки, и клетка Компоненты. Другие образцы, которые могут быть использованы для диагностики включают стул образцы и носоглоточные аспираты.

[0978] термин "антитело" охватывает поликлональные и моноклональные антитела препараты, а также препараты, включающие гибридные антитела, измененные антитела, химерные антитела и гуманизированные антитела, а также гибридные (химерные) молекулы антител (см., например, зима и др. (1991) Nature 349: 293-299; и U. S. Pat. No. 4.816.567); F (ab')₂ и фрагменты F (ab); молекулы Fv (нековалентные гетеродимеры, см., например, Inbar et al. (1972) Proc Natl Acad Sci USA 69: 2659-2662; и Эрлих и др. (1980) Biochem 19:4091-4096); одноцепочечные молекулы Fv (sFv) (см., например, Huston et al. (1988) Proc Natl Acad Sci USA 85:5879-5883); олигобелки; димерные и тримерные фрагмент антитела конструирует; minibodies (см., например, пакет

al. (1992) *Biochem* 31: 1579-1584; Cumber et al. (1992) *J Иммунология* 149B: 120-126); гуманизированные молекулы антител (см., например, Riechmann et al. (1988) *природа* 332:323-327; Верхоян и др. (1988) *наука* 239:1534-1536; и патент Великобритании Публикации Нет. GB 2,276,169, опубликовано 21 Sep. 1994); и, любой функциональные фрагменты, полученные из таких молекул, где такие фрагменты сохраняют специфические связывающие свойства молекулы родительского антитела.

[0979] как использовано здесь, термин "моноклональное антитело" ссылается к антителная композиция, имеющая однородную популяцию антител. Срок не ограничен относительно вида или источника антитела, ни оно предназначенный быть ограниченным способом, которым это сделано. Срок включает в себя целые иммуноглобулины.

[0980] известны способы получения поликлональных и моноклональных антител в искусстве. Поликлональные антитела генерируются путем иммунизации подходящего животного, как мышь, Крыса, Кролик, Овца или козочка, с антигеном интерес. Для того чтобы увеличить иммуногенность, антиген можно соединить к носителю до иммунизации. Соответствующие несущие типично крупные, медленно метаболизируемые макромолекулы, такие как белки, полисахариды, полимолочные кислоты, полиглицоловые кислоты, полимерные Амины кислоты, сополимеры аминокислот, липидные агрегаты (такие как капли масла или липосомы) и неактивные вирусные частицы. Такие перевозчики хорошо известны к те, кто обладает обычным мастерством в этом искусстве. Кроме того, антиген может быть конъюгированный с бактериальным анатоксином, таким как анатоксин от дифтерии, столбняк, холера и др., в целях повышения их иммуногенности.

[0981] кролики, овцы и козы предпочтительны для подготовки поликлональные сыворотки, когда требуются большие объемы сывороток. Эти животные являются хороший выбор дизайна также из-за наличия маркированных анти -- кролик, анти -- овцы и антитела анти -- козочки. Иммунизация-это обычно выполняется путем смешивания или эмульгирования антигена в физиологическом растворе, предпочтительно в адьюванте, таком как полный адьювант Фрейнда ("FCA"), и парентеральное введение смеси или эмульсии (обычно подкожно или внутримышечно). Животное обычно усиливается через 2-6 недель с помощью одна или несколько инъекций антигена в физиологическом растворе, предпочтительно с использованием Неполный адьювант Фрейнда ("FA"). Антитела могут также быть произведены мимо иммунизация *in vitro* с использованием методов, известных в данной области техники. Поликлональный затем антисера получают из иммунизированного животного.

[0982] моноклональные антитела обычно получают с использованием метода Kohler & Milstein (1975) *Nature* 256:495-497, или их модификация, как описано выше.

Способы Обнаружения Нуклеиновых Кислот

[0983] существует много хорошо известных методов усиления таргетинга последовательности, такие как полимеразная цепная реакция (ПЦР), обратные транскрипционная ПЦР (RT-PCR), лигазная цепная реакция (LCR), прядь амплификация смещения (SDA), и последовательность нуклеиновой кислоты-основанная амплификация (NASBA), транскрипция-опосредованная амплификация (ТМА) для того чтобы назвать немного. Эти методы в общем описываются в следующих ссылках: (PCR) Пат США. № 4 683 195, 4 683 202 и 4 800 159; (RT-PCR) U. S. Похлопывать. № 5,310,652, 5,322,770; (LCR) EP заявка№., 320,308 опубликовано в июне. 14, 1989; (SDA) U. S. Pat. № 5,270,184 и 5,455,166 и "эмпирические аспекты усиления смещения пряди" Г. Т. Способы и приложения Walker in PCR, 3(1):1-6 (1993), холодная весна Harbor Laboratorium Press; (ТМА) U. S. Pat. № 5.399.491, и (НАСБА) "Амплификация на основе последовательности нуклеиновых кислот (NASBA.ТМ.)" by L. Malek et Аль., Гл. 36 "методы в молекулярной биологии", т. 28: протоколы для Анализ нуклеиновых кислот с помощью нерадиоактивных зондов, 1994 год Изд. П. Г. Айзек, Humana Press, Inc., Totowa, N. J. методы ПЦР могут включать вариации, которые разрешить количественное определение целевой последовательности, например, методом ПЦР в реальном времени анализ (например, как описано в патенте США. № 5,210,015, 5,487,972, В частности, 5 994 056, 6 171 785). (Каждая из приведенных выше ссылок является настоящим включены по ссылке).

[0984] один из вариантов осуществления способа осуществления изобретения для обнаружения наличие вируса торс в образце включает в себя предоставление образца подозреваемого о содержании нуклеиновой кислоты-мишени вируса ОРВИ, амплифицирующей шаблон последовательность, содержащаяся в указанной мишени нуклеиновой кислоты вируса атипичной пневмонии, любой известный способ амплификации нуклеиновых кислот, в том числе любой из них упомянутый здесь, используя олигонуклеотидные праймеры, описанные здесь, в частности, те праймеры, которые содержат описанные здесь наборы, и обнаруживать усиленную последовательность шаблона, где присутствие амплифицированной последовательности шаблона указывает на присутствие вируса SARS в указанной последовательности образец.

[0985] методы усиления обычно включают использование двух праймеров. Там, где целевая последовательность является одноцепочечной, методы в целом включите предварительный этап, на котором делается дополнительная нить в приказываю дать двусторчатую мишень. Эти два праймера гибридизируются в различные Стренги двух-сели на мель цели и после этого удлинены. Выдвинутые продукты могут служить как цели для более дальнейших раундов гибридизация / расширение. Чистый эффект заключается в усилении последовательности шаблонов в пределах цели, 5' и 3' Термини шаблона определяется с помощью расположение двух праймеров в мишени. В качестве альтернативы, если один или оба из праймеров содержат последовательность промотора после этого цель может быть амплифицированным (путем транскрипции) с использованием РНК-полимеразы (как в ТМА).

[0986] настоящее изобретение предоставляет способы и наборы для усиления и / или обнаружение шаблона или целевой последовательности в вирусном нуклеусе SARSV кислота. Изобретение обеспечивает набор, содержащий праймеры для усиления а последовательность шаблона, содержащаяся в мишени нуклеиновой кислоты SARSV, комплект содержит первый праймер и второй праймер, где первый праймер-это первый грунт. содержит последовательность, существенно дополняющую часть указанного последовательности шаблона и второй праймер содержит последовательность существенно дополняет собой часть указанного комплемента шаблонная последовательность, в которой последовательности внутри указанных праймеров имеют существенная комплементарность определяет Термини последовательности шаблонов чтобы быть усиленным.

[0987] комплекты изобретения могут дополнительно содержать зонд, который является существенно дополняют последовательность шаблонов и / или ee элементы комплемент и который может скрещиваться с ним. Этот зонд можно использовать в а способ гибридизации для обнаружения усиленного шаблона или выделения (т. е. "захват") амплифицированного шаблона или исходной целевой нуклеиновой кислоты.

[0988] наборы изобретения могут дополнительно содержать праймеры и / или зонды для генерирования и обнаружения внутреннего стандарта, чтобы помочь количественные измерения (например, Fille et al. 1997 *Biotechniques* 23: 34-36).

[0989] наборы изобретения могут дополнительно содержать ДНК-полимеразу, которая как правило, это термостабильная ДНК-полимераза, где неизотермическая процесс амплификации должен быть использован. Комплекты также могут содержать расходные материалы днттс, соль магния (например MgCl₂.SUB.2), буферные растворы и др.

[0990] комплекты изобретения могут содержать более одной пары праймеров (например, для вложенного усиления), и один праймер может быть общим для нескольких чем одна пара праймеров. Комплект также может содержать более одного зонда.

Олигомерные зонды и праймеры

[0991] в связи с методами детекции нуклеиновых кислот на настоящее изобретение, описанное выше, олигомеры, имеющие сходство последовательности, или комплементарность, чтобы геном SARSV были полезны. Геном SARSV последовательности, упомянутые здесь, могут быть использованы для производства зондов и праймеров что можно использовать в ассайс для обнаружения нуклеиновых кислот в тесте образцы. Зонды могут быть сконструированы из сохраненных нуклеотидных областей представляющие интерес полинуклеотиды или из несохраненных областей нуклеотидов из интересующего нас полинуклеотида. Конструкция таких зондов для оптимизация в анализах находится в пределах навыка тех из обычных навыков в искусстве. Вообще, зонды нуклеиновой кислоты начаты от non-conserved или уникальные регионы когда максимальная специфичность желана, и нуклеиновая кислота зонды разрабатываются из сохраненных областей при анализе на нуклеотид регионы, которые тесно связаны, например, с

различными членами группы а мультигенная семья или в родственных видах, таких как мышь и человек.

[0992] использование в качестве основы генома SARSV, который может быть найден так, как описано таким образом, и / или предпочтительно сохраненные области генома SARSV, и/или в частности описанные праймерные и зондовые последовательности раскрыты при этом могут быть получены олигомеры примерно 8 нуклеотидов и более которые гибридизуют с положительной нитью(АМИ) РНК SARSV или ее комплемент, а также к САРСВ-кднк. Эти олигомеры могут служить в качестве зонды для обнаружения (включая изоляцию и / или маркировку) полинуклеотиды, содержащие нуклеотидные последовательности SARSV, и/или в виде праймеры для транскрипции и / или репликации целевого SARSV последовательности. Олигомеры содержат целевую полинуклеотидную последовательность, который состоит из нуклеотидов, которые комплементарны к мишени Последовательность нуклеотида SARSV; последовательность достаточной длины и комплементарность с последовательностью SARSV для того чтобы сформировать дуплекс который имеет достаточная стабильность для поставленной цели. Например, если цель заключается в выделении путем иммобилизации аналита, содержащего а целевая последовательность SARSV, олигомеры будут содержать полинуклеотид регион, обладающий достаточной протяженностью и взаимодополняемостью с целевой группой Последовательность SARSV для того чтобы позволять достаточную двухшпindelную стабильность лишить подвижности Аналит на твердой поверхности, через свою связь к олигомерам, под условия изоляции. Например, также, если олигомеры служат как праймеры для транскрипции и / или репликации целевого SARSV последовательности в полинуклеотиде аналита, олигомеры содержали бы а полинуклеотидная область достаточной длины и комплементарности к целевая последовательность SARSV, позволяющая полимеризующему агенту продолжать работу репликация от праймеров которые находятся в стабилизированной двухшпindelной форме с целевая последовательность, в условиях полимеризации. Например, также, если олигомеры должны использоваться в качестве пробников этикеток или связываться с мультимеры, прицельная полинуклеотидная область была бы достаточной длина и комплементарность для того чтобы сформировать стабилизированные гибридные двухшпindelные структуры с ярлык зондирует and / or вольтамперомеры для того чтобы позволить обнаружению дуплекса. То олигомеры могут содержать как минимум около 4 смежных нуклеотидов, которые комплементарны к пристрелной последовательности SARSV; обычно олигомеры будут содержать минимум около 8 смежных нуклеотидов, которые являются комплементарно к пристрелной последовательности SARSV, и предпочтительно будет содержать как минимум около 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20,21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, или 30 смежных нуклеотидов и до около 50, 75, 100, 200 непрерывные нуклеотиды или больше, которые комплементарны к пристрелному Последовательность САРСВА.

[0993] как правило, для использования в методах, основанных на усилении (для пример, ПЦР, РТ-ПЦР, ТМА) олигомеры будут использованы как праймерные наборы такие что один элемент набора праймеров имеет сходство последовательности или комплементарность к более сохраненной (среди коронавируса) части Геном SARSV и другой член набора праймеров имеет последовательности сходство или взаимодополняемость с менее сохраненной частью. Грунтовка наборы можно использовать для усиления целевой области хорошо известными способами в искусстве. Как правило, 5 'непереведенная область (5'UTR) и 3' непереведенные области (3'UTR) относятся к числу наиболее консервативных регионов. ИНЖИР. 8 показывает выравнивание 5'UTR нескольких коронавируса. ИНЖИР. 10 шоу выравнивание 3'UTR нескольких коронавируса. ФИНИК. 9 и 11 шоу последовательности предпочтительных праймеров для усиления 5'UTR и 3'UTR, соответственно. Другие праймеры и зонды можно охотно конструировать на основе приведенных здесь последовательностей выравниваний.

[0994] олигомер, однако, не обязательно должен состоять только из последовательности, которая дополняет целевую последовательность SARSV. Он может содержать в себе: добавление, нуклеотидные последовательности (например, промоторы) или другие фрагменты, которые пригодны для тех целей, для которых используются олигомеры. Для например, если олигомеры используются в качестве праймеров для амплификации Последовательности SARSV с помощью, например, ПЦР, они могут содержать последовательности, которые, когда в дуплексе, сформируйте сайты энзима ограничения которые облегчают клонирование усиленных последовательностей. Например, также, если олигомеры они должны использоваться в качестве "зондов захвата" в гибридизационных анализах, они будут использоваться как "зонды захвата". содержат дополнительно связующий партнер, который связан с олигомером содержащая нуклеотидную последовательность, которая комплементарна к целевой Последовательность САРСВА. Другие типы moieties или последовательностей, которые полезны из которые олигомеры могут быть включены или соединены к, те которые известный в искусстве, чтобы быть пригодным для различных целей, в том числе маркировка нуклеотидных зондов.

[0995] Таблица 4 (SEQ ID NOS: 1021-6020) показывает прямые и обратные праймеры которые полезны для амплификации нуклеиновых кислот SARSV для диагностики и методы скрининга.

[0996] предпочтительные праймеры и зонды для обнаружения нуклеиновых кислот SARS для диагностика и скрининг являются SEQ ID NOS: 7332-7336 (прямые праймеры), SEQ ID NOS: 7337-7341 (обратные праймеры) и SEQ ID NOS: 7342-7352 (зонды). Эти праймеры и зонды полезны для обнаружения последовательностей в 3' СРР.

[0997] любой из вышеуказанных форвардных праймеров может использоваться в сочетании с любой из вышеперечисленных обратных праймеров для амплификации нуклеиновой кислоты SARSV. Усиленный продукт может быть обнаружен (или захвачен) любым из вышеперечисленных способов зонды. Особенно предпочтительны комбинации прямого и обратного хода праймеры и зонды для обнаруживать усиленный продукт включают: Передний SEQ ID NO: 7332 с обратным SEQ ID NO: 7337, 7338, 7339 или 7341 и зонд SEQ ID NO: 7342; передний SEQ ID NO: 7333 или 7334 с обратным SEQ ID NO: 7340 и любой из зондов SEQ ID NO: 7343-7351; передний SEQ ID Нет: 7335 и обратный SEQ ID нет: 7340 или 7341 и любой из зондов SEQ ID нет: 7342-7352. Другие комбинации прямого и обратного праймеров и соответствующие зонды могут охотно быть определены теми умелый в искусстве из приведенной выше информации.

[0998] дополнительные предпочтительные праймеры и зонды для нуклеиновой кислоты SARS обнаружение для диагностики и скрининга являются SEQ ID NOS: 7353-7362 (вперед праймеры), SEQ ID NOS: 7363-7373 (обратные праймеры) и SEQ ID NOS: 7374-7385 (зонды). Праймеры и зонды полезны для обнаружения последовательности в 5' UTR.

[0999] вышеуказанные праймеры могут использоваться в комбинации для усиления SARSV нуклеиновая кислота следующим образом: любой из форвардов праймеров SEQ ID нет: 7353-7356 с любым из обратных праймеров SEQ ID NO: 7363-7366, 7368 и усиленный продукт обнаружен (или захвачен) с зондами SEQ ID NO: 7374; любой передних праймеров SEQ ID NO: 7357-7362 с любым из обратных праймеров SEQ ID NO: 7367, 7369-7373 и обнаруженные усиленные продукты (или захваченные) с любым из зондов SEQ ID нет: 7375-7385. Особенно предпочтительно комбинации прямых и обратных праймеров и зондов являются следующими: вперед праймеры SEQ ID NO: 7353-7356 с любым из обратных праймеров SEQ ID NO: 7363-7366 и зонды SEQ ID нет: 7374; передние праймеры SEQ ID нет: 7357-7358 с обратными праймерами SEQ ID нет: 7367, 7369 и зонды SEQ ID Нет: 7375 или 7376; передние праймеры SEQ ID нет: 7357-7359 с обратным праймеры SEQ ID NO: 7367, 7369 или 7370 и зонд SEQ ID NO: 7375 или 7376. Более предпочтительными являются комбинации SEQ ID NO: 7353 или 7354 с SEQ ID Нет: 7363 или 7364 и зонд SEQ ID нет: 7374. Другие комбинации форварда и обратные праймеры и соответствующие зонды могут охотно быть определены мимо те, кто искусен в этом искусстве из вышеуказанной информации. А именно: сохраненная последовательность октануклеотидов (SEQ ID NO: 7386) встречается в 3'UTR торс (приблизительно 70-80 оснований от конца 3') и нескольких других Коронавирусы, которые могут быть особенно полезны при идентификации SARSV. Грунтовки, в том числе и в этой области, предпочтительно комбинируют с обратными праймеры из областей последовательности, которые более специфичны для SARS.

[1000] в дополнение к вышесказанному, межгеновая последовательность (IS), которая является характеристика коронавируса была определена в SARSV (см. выше). Это минимально включает последовательность АСГААС (SEQ ID NO: 7293), которая происходит вверх по течению от каждого открытого кадра считывания (ORF) в вирусном геноме. То 5'UTR который включает IS соединен на 5' конец каждой вирусной мРНК на месте или рядом с участком ИГ. Таким образом, праймеры, содержащие IS или его комплемент полезны для амплификации вирусных нуклеиновых кислот, в том числе кднк, полученная из вирусных РНК. Таким образом, изобретение содержит набор праймеры в которых один праймер состоит из АСГААС (SEQ ID NO: 7293) или его комплемент (SEQ ID NO: 7387) и один праймер содержит любые соответствующие компоненты последовательность из генома SARS, или комплементарная последовательность. Полезные зонды для обнаружения и / или захвата вирусных РНК или кднк, полученных из вируса РНК могут также содержать последовательность IS, или ее комплемент, описанный выше.

[1001] один набор праймеров для усиления последовательностей SARS, в частности, с помощью РТ-ПЦР, использует SEQ ID NOS 6562, 6563, 6564 и 6565. От эти, 6562 & 6564 праймеры чувства и 6563 & 6565 антисмыслы грунтовки. Праймеры SEQ ID NOS: 6562 & 6565 могут быть использованы в

первом усилении, причем второе вложенное усиление выполняется с использованием праймеры SEQ ID NOS: 6563 & 6564. В некоторых вариантах осуществления изобретения, эти четыре праймера исключены.

[1002] один набор для усиления и обнаружения последовательностей SARS, в частности RT-PCR, использует по 6567 & 6568 удостоверения личности SEQ как праймеры, и SEQ ID NO 6566 в качестве зонда (обычно обозначается, например, TAMRA и / или FAM) для усиленной последовательности. В некоторых вариантах осуществления изобретения эти праймеры и зонд исключены.

[1003] один набор для усиления и обнаружения последовательностей SARS, в частности RT-PCR, использует SEQ если NOs 7395 & 6568 как праймеры, и SEQ ID NO 6566 в качестве зонда (обычно обозначается, например, TAMRA и / или FAM) для усиленной последовательности. В некоторых вариантах осуществления изобретения эти праймеры и зонд исключены.

[1004] один набор для амплификации последовательностей SARS, в частности ген нуклеокапсида, использует Seq ID nos 6560 & 6561 в качестве праймеров. В некоторых варианты осуществления изобретения, эти грунты исключены.

[1005] один набор для усиления последовательностей SARS использует SEQ ID NOs 6496, 6497, 6562, 6563, 6564 & 6565 как праймеры. В некоторых вариантах осуществления изобретения, эти праймеры исключены.

[1006] один набор для амплификации последовательностей SARS использует SEQ ID nos 6562, 6563, 6564 & 6565 как праймеры. В некоторых вариантах осуществления изобретения эти грунтовокки исключены.

[1007] один набор для усиления последовательностей SARS использует SEQ ID NOs 6500, 6501, 6502 & 6503 как праймеры. В некоторых вариантах осуществления изобретения эти грунтовокки исключены.

[1008] один набор для усиления последовательностей SARS использует SEQ ID NOs 6496, 6497, 6500, 6501, 6502, 6503, 6562, 6563, 6564 & 6565 как праймеры. В некоторых варианты осуществления изобретения, эти грунты исключены.

[1009] один набор для усиления и обнаружения последовательностей SARS, особенно в реальном времени (например TaqMan.TM.) PCR, использует SEQ ID nos 6567 & 6568 как праймеры, и SEQ ID NO 6566 как зонд (типично обозначенный например с TAMRA и / или FAM) для усиленной последовательности. В некоторых вариантах осуществления изобретения, эти праймеры и зонд исключены.

[1010] один набор для усиления и обнаружения последовательностей SARS, особенно в реальном времени (например TaqMan.TM.) PCR, использует SEQ ID NOs 7395 & 6568 как праймеры, и SEQ ID NO 6566 как зонд (типично обозначенный например с TAMRA и / или FAM) для усиленной последовательности. В некоторых вариантах осуществления изобретения, эти праймеры и зонд исключены.

[1011] один набор для усиления и обнаружения последовательностей SARS использует SEQ ID nos 6562, 6565 и 6568 в качестве праймеров, а SEQ ID NOs 7396 и 7397 в качестве зонды (обычно помеченные, например, с помощью TAMRA и / или FAM) для усилителя последовательности. В некоторых вариантах осуществления изобретения эти праймеры и зонд исключаются.

[1012] один набор для амплификации и обнаружения последовательностей SARS использует олигонуклеотид, содержащий SEQ ID NO: 9780 в качестве прямого праймера, an олигонуклеотид, содержащий SEQ ID NO: 9781 в качестве обратного праймера, и An олигонуклеотид, содержащий SEQ ID NO: 9782 в качестве зонда.

[1013] предпочтительные последовательности для использования с RT-PCR и LightCycler анализом включить SEQ ID NOs 6562, 6568, 6565, 7396 & 7397. В некоторых вариантах осуществления изобретения, эти праймеры и зонд исключены.

[1014] получение олигомеров с помощью известных в технике, в том числе, например, методами, которые включают иссечение, транскрипцию, или химический синтез. Целевые последовательности и / или области генома которые выбраны к которым пристреливая полинуклеотиды олигомеры комплементарны зависят от цели. Например, если цель состоит в том, чтобы проверить наличие SARSV в биологических образцах (например кровь, дыхательный материал, печень, легкое), предпочтительные олигомеры были бы быть использованным как зонды и / или праймеры, и гибридивал бы для того чтобы сохранить регионы генома SARSV. Некоторые из заповедных регионов CAPCSA здесь описан, например, геном, с которым могут связываться олигомеры, 5'UTR и 3'UTR.

[1015] в основном анализе гибридизации нуклеиновых кислот, одноцепочечный нуклеиновая кислота (либо ДНК, либо РНК) гибридизуется с нуклеиновой кислотой зонд, и полученные дуплексы обнаружены. Зонды для SARSV полинуклеотиды (природные или производные) имеют длину, которая позволяет Обнаружение уникальных вирусных последовательностей путем гибридизации. Пока 6-8 нуклеотиды могут быть работоспособной длины, последовательности из 10-12 нуклеотидов являются предпочтительнее, да и около того 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, или 21 или больше нуклеотиды или более представляются оптимальными. Желательно, чтобы эти последовательности были происходят из регионов, в которых отсутствует гетерогенность. Эти зонды могут быть приготовлено рутинными методами, включающими автоматизированный олигонуклеотид синтетический метод. Среди полезных зондов, например, есть производные из менее сохраненных областей генома SARSV. Регионы генома что типично более менее сохранено смогите охотно быть установлено от последовательность выравниваний, предусмотренных в настоящем документе, а также любыми другими хорошо известными методы. Комплемент к любой уникально части генома SARSV будет будь доволен. Для пользы как зонды, полная комплементарность желательно, хотя это может быть и не нужно, так как длина фрагмента составляет увеличился.

[1016] для использования таких зондов в качестве агентов для обнаружения присутствия SARSV полинуклеотиды (например, при скрининге на наличие зараженной крови или для диагностика инфицированных лиц), биологический образец для анализа, как, без ограничения, кровь, сыворотка, легкое, печень, слизистая, почка, слюна, или мокрота, может быть обработана, если пожелано, для того чтобы извлечь нуклеиновое содержащиеся в нем кислоты. Полученная нуклеиновая кислота из образца может подвергните к электрофорезу геля или другим методам разъединения размера; кроме того, образец нуклеиновой кислоты может быть точечным пятном без размера разделение. Для формирования гибридных дуплексов с последовательностью таргетинга зонда, пристреливая зона нуклеиновой кислоты analyte должна находиться внутри одиночная, Котор сели на мель форма. Где последовательность естественно присутствует в одиночном сели на мель форма, денатурация не потребует. Однако, где то последовательность присутствует в двойной многожильной форме, последовательность будет денатурированный. Денатурацию можно проводить различными методами известными в искусство. После денатурации, Аналит нуклеиновой кислоты и зонда инкубируются в условиях, способствующих стабильному гибридообразованию последовательность цели в зонде с предполагаемой пристреливой последовательностью внутри Аналит, и приводя к дуплексы содержа зонд(ы) являются следующими обнаруженный.

[1017] обычно выполняется обнаружение полученного дуплекса, если таковой имеется при использовании меченых зондов; в качестве альтернативы, зонд может быть немаркирован, но может быть обнаружен специфическим связыванием с лигандом который обозначен, прямо или косвенно. Подходящие этикетки и способы маркировки зонды и лиганды известны в технике, и включают, например, радиоактивные метки, которые могут быть включены известными методами (например, Ник перевод или киназирование), биотин, флуоресцентные группы, хемилюминесцентные группы (например, диоксетаны, в частности вызванные диоксетаны), ферменты, антитела и тому подобное.

[1018] область зондов, которые используются для связывания с анализируемым веществом, может быть полностью комплементарным к геному SARSV. Поэтому, как правило условия высокой строгости являются желательными для предотвращения ложных срабатываний позитивы. Однако условия высокой строгости следует использовать только в том случае, если зонды комплементарны к зонам вирусного генома которые нуждаются неоднородность. Строгость гибридизации определяется числом факторов во время гибридизации и во время процедуры промывки, включая температуру, ионную прочность, продолжительность времени и концентрацию из формамида. Эти факторы изложены, например, в Маниатис т. (1982).

[1019] варианты этой основной схемы, которые известны в искусстве, в том числе те, которые облегчают разделение дуплексов, которые будут обнаружены из посторонних материалов и / или которые усиливают сигнал от обозначенной moiety, может также быть использована. Некоторые из этих вариантов являются рассмотрено, например: Matthews & Kricka (1988), *Analytical Biochemistry* 169:1; Landegren et al. (1988), *Science* 242: 229; и Миттлин (1989), *Клиническая Химия*. 35:1819. Эти и следующие публикации: описывая форматы assay hereby включены ссылкой здесь. Зонды соответствующие для обнаруживать SARSV в этих анализах состоят из последовательности, которые гибридизуются с последовательностями целевого ПОЛИНУКЛЕОТИДА SARSV, чтобы формируют дуплексы с Аналит-нитью, причем дуплексы имеют вид достаточная стабильность для обнаружения в указанной системе анализа.

[1020] подходящим вариантом является, например, тот, который описан в Американский Пат. № 4.868,105, выпущено в сентябре. 9, 1989, и в публикации EPO нет. 225,807 (опубликовано в июне. 16, 1987). Эти публикации описывают решение проблемы фазовый анализ гибридизации нуклеиновых кислот, в котором Аналит нуклеиновая кислота гибридизуется с набором маркирующих зондов и набором захватывающих зондов. То зондово-аналитический комплекс связан гибридизацией с твердосплавным носителем захват зонда, который дополняет набор зонда захвата. Этот позволяет Аналит нуклеиновой кислоты быть удалены из раствора в качестве твердого вещества фазовый комплекс. Именуемый Аналит в виде твердофазного комплекса облегчает последующие шаги разъединения в assay. Обозначая зонд набор комплементарен к обозначенному зонду который прыгнут до конца гибридизация с твердофазным / Аналит-комплексом.

[1021] полимеразная цепная реакция (ПЦР) является методом амплификации желаемая последовательность нуклеиновых кислот (мишень), содержащаяся в нуклеиновой кислоте или их смесь. В PCR, пара праймеров использована в избытке к гибридизуется с комплементарными нитями целевой нуклеиновой кислоты. То праймеры каждый удлиняются полимеразой с использованием целевой нуклеиновой кислоты в качестве шаблона. Продукты расширения сами становятся целевыми последовательностями, после диссоциации от исходной целевой нити. Тогда новые грунтовки гибридизованы и расширены полимеразой, и цикл повторен к геометрической увеличите количество молекул целевой последовательности. ПЦР-это раскрыто в американском Пат. № 4 683 195 и 4 683 202, которые являются включенный здесь ссылкой.

[1022] лигазная цепная реакция (LCR) является альтернативным методом для нуклеиновых кислот. усиление кислоты. В LCR используются зондовые пары, которые включают два первичный (первый и второй) и два вторичных (третий и четвертый) зонды, все из которых использованы в молярном избытке для того чтобы пристрельть. Первый зонд гибридизуется с первым сегментом целевой нити, а второй зонд гибридизуется со вторым сегментом целевой нити, первым и вторым сегменты, являющиеся смежными так, что первичные зонды примыкают друг к другу в 5' фосфат-3' гидроксильное отношение, и так, чтобы лигаза могла ковалентно сплавить или перевязать 2 зонда в сплавленный продукт. В добавление, третий (вторичный) зонд может гибридизировать к части первый зонд и четвертый (вторичный) зонд могут гибридизировать к части второй зонд в таком же примыкающем образе. Конечно, если цель первоначально двойник сел на мель, вторичные зонды также гибридизуют к целевой комплемент в первую очередь. После того, как перевязанная нить первичные зонды отделены от Стренги цели, его гибридизуют с третьим и четвертым зондами которые можно перевязать для того чтобы сформировать а комплементарный, вторичный лигатурный продукт. Важно понимать, что лигированные продукты функционально эквивалентны либо целевой, либо его дополнение. Путем повторных циклов гибридизации и лигирования, достигается усиление целевой последовательности. Эта техника является более подробно описано в EP-A-320 308 to K. Backman опубликовано Jun. 16, 1989 и EP-a-0439182 to K. Backman et al., опубликовано в июле. 31, 1991, оба из которых включены здесь по ссылке.

[1023] для амплификации мРНК, это находится в рамках настоящего исследования изобретение для обратной транскрипции мРНК в кднк с последующей полимеразой цепная реакция (RT-PCR); или, использовать одиночный фермент для обоих шагов как описанный в США Пат. No. 5,322,770, который включен здесь мимо ссылка; или обратная транскрипция мРНК в кднк с последующей асимметрией цепная реакция gap ligase (RT-AGLCR) как описано R. L. Marshall et Аль., *Методы и приложения ПЦР* 4: 80-84 (1994), который также является включенный здесь ссылкой.

[1024] TMA подробно описан, например, в документе U. S. Pat. № 5.399.491, раскрытие которой включено здесь путем ссылки в полном объеме. В одном из примеров типичного анализа выделенный образец нуклеиновой кислоты, подозреваемый в содержании целевой последовательности SARSV, смешивается с буфером концентрат, содержащий буфер, соли, магний, нуклеотид ТРИФОСФАТЫ, праймеры, дитиотреитол и спермидин. Реакция есть обязательно инкубировать при температуре около 100.степень. С. Примерно для двух человек минуты для того чтобы денатурировать любую вторичную структуру. После охлаждения в помещении температура, обратная транскриптаза, РНК-полимераза и Рнказа Н добавляются и смесь инкубируют в течение двух-четырёх часов при 37 ° С.степень. С. The реакция может после этого быть assayed путем денатурировать продукт, добавляя зонд раствор, инкубируя 20 минут на 60.степень. С., добавление решения к селективно гидролизуйте негибридизованный зонд, инкубируя реакцию шесть минут через 60.степень. С., и измерять остальную хемилюминесценцию в люминометре.

[1025] как правило, TMA включает следующие шаги: (a) выделение нуклеиновых кислот кислота, включая РНК, из биологической пробы, представляющей интерес, подозреваемая в том, что будучи инфицированным SARSV; и (b) объединение в реакционную смесь (i) выделенные нуклеиновые кислоты, (ii) первый и второй олигонуклеотидные праймеры, первый праймер, имеющий достаточно комплементарную комплексобразующую последовательность к 3' концевой части целевой последовательности РНК, если она присутствует (для пример той (+) пряди), чтобы сложить вместе с ней и второй грунт имея комплексобразующую последовательность, достаточно комплементарную к 3' терминальная часть целевой последовательности ее дополнения (например, (-) нить) к комплексу с ней, где первый олигонуклеотид далее содержит последовательность 5' к последовательности комплексирования, которая включает в себя: промотор, (iii) обратная транскриптаза или РНК и ДНК-зависимая ДНК полимеразы, (iv) активность фермента, который избирательно деградирует РНК нить комплекса РНК-ДНК (например, РНКазы Н) и (v) РНК полимеразы, которая распознает промотор.

[1026] компоненты реакционной смеси могут быть объединены ступенчато или сразу. Реакционную смесь инкубируют в условиях, при которых олигонуклеотид / последовательность цели сформированы, включая заправку ДНК и условия синтеза нуклеиновых кислот (включая рибонуклеотид ТРИФОСФАТЫ и дезоксирибонуклеотидные ТРИФОСФАТЫ) в течение определенного периода времени достаточно для обеспечения нескольких копий целевой последовательности. То реакция преимущественно протекает в условиях, подходящих для поддержания стабильности компонентов реакции, таких как компонент ферменты и не требующие модификации или манипуляции реакцией условия во время проведения реакции усиления. Соответственно, реакция может протекать в условиях, которые по существу являются изотермические и включают существенно постоянн ионную прочность и ПЭ-аш. The реакция удобно не требует шага денатурации для того чтобы отделить комплекс РНК-ДНК, полученный в результате первой реакции расширения ДНК.

[1027] соответствующие полимеразы ДНК включают обратные транскриптазы, как вирус миелобластома птиц (AMV) обратная транскриптаза (доступно от, например, Seikagaku America, Inc.) и вирус лейкоза мышей Молони (MMLV) обратная транскриптаза (доступна, например, в исследовании Bethesda Лаборатории).

[1028] промоторы или промоторные последовательности, пригодные для включения в состав праймеры представляют собой последовательности нуклеиновых кислот (либо природные, производимые синтетически или продукт дайджеста ограничения) которые специфически распознается РНК-полимеразой, которая распознает и связывается с ней последовательности и инициирует процесс транскрипции, в результате чего РНК составляет стенограммы заседаний. Последовательность может необязательно включать нуклеотид основания, выходящие за пределы собственно сайта распознавания для РНК-полимеразы что может придать дополнительную стабильность или восприимчивость к деградации процессы или повышенная эффективность транскрипции. Примеры полезной работы промоторы включают те, которые распознаются определенным бактериофагом полимеразы, такие как бактериофаг T3, T7 или SP6, или промотор от кишечной палочки. Эти полимеразы РНК охотно-доступны от рекламы источники, такие как New England Biolabs и Epicentre.

[1029] некоторые из обратных транскриптаз пригодны для использования в методах здесь имейте деятельность при Рнказы, как обратная транскриптаза AMV. IT однако может быть предпочтительнее добавлять экзогенную Рнказу Н, такую как E. coli Рнказа Н, даже когда AMV обратная транскриптаза использована. Рнказа Н легко обнаруживается доступны, например, в исследовательских лабораториях Bethesda.

[1030] транскрипты РНК, полученные этими методами, могут служить в качестве шаблоны для создания дополнительных копий целевой

последовательности через вышеописанные механизмы. Система является автокаталитической и усилительной происходит автокаталитически без необходимости многократного изменения или изменяя условия реакции как температура, ПЭ-аш, ионная прочность или подобный.

[1031] обнаружение может быть сделано используя большое разнообразие методов, включая прямое секвенирование, гибридизация со специфичными к последовательности олигомерами, гель электрофорез и масс-спектрометрия. Эти методы можно использовать гетерогенные или однородные форматы, изотопные или неизотопные метки, а также ну и вообще никаких ярлыков.

[1032] соответствующие обозначая моетес для приложения к праймерам и/или к зонды, используемые в способах осуществления изобретения, включают, но не ограничиваются: 5-Фам (также называемый 5-карбоксифлуоресцен; также называемый Спиро (изобензофуран-1 (3Н), 9' -(9Н)Ксантен) - 5-карбоновая кислота, 3', 6' - дигидрокси-3-оксо-6-карбоксифлуоресцен; 5-Гексахлорфлуоресцен ([4,7,2',4',5',7'-гексахлор-(3',6'-дипивалоилфлуоресценнил) - 6-карбоновая кислота кислота); 6-Гексахлор-флуоресцен ([4,7,2',4',5',7'-гексахлор-(3',6'-дипивалоилфлуоресценнил) - 5-карбоновая кислота кислота); 5-Тетрахлорфлуоресцен ([4,7,2',7' - тетрачлор - (3', 6' - дипивалоилфлуоресценнил) - 5-карбоновая кислота кислота); 6-Тетрахлорфлуоресцен ([4,7,2', 7' - тетрачлор - (3', 6' - дипивалоилфлуоресценнил)-6-карбоновая кислота кислота); тетраметилпроламины (Тамра), в том числе (i) 5-Тамра (5-карбокситетраметилпроламин; Ксантилил, 9-(2,4-дикарбоксифенил) - 3,6-бис (диметиламино) и (ii) 6-Тамра (6-карбокситетраметилпроламин; Ксантилил, 9-(2,5-дикарбоксифенил) - 3,6-бис (диметиламино); EDANS (5-((2-аминоэтил) амино) нафталин-1-сульфокислота); 1,5-IAEDANS (5-((2-иодацетил) амино) этил) амино)нафталин-1-сульфокислота); ДАБСИЛ (4-((4 - (диметиламино) фенил) Азо) бензойная кислота); Су5 (Индодикарбоцианин-5); Су3 (Индодикарбоцианин-3); и BODIPY.TM. FL (4,4-дифтор-5,7-диметил-4-Бора-3а, 4а-Диазо-5-индацен-3-пропионовая кислота кислота). Маркировка зондов как FAM (например, при 5'), так и TAMRA (например, при 3') является предпочтительным.

[1033] нуклеиновые кислоты данного изобретения могут быть использованы в растворе или могут быть привязка к твердой матрице или поддержка, например, в формате массива ДНК,

[1034] как легко видно, дизайн анализов, описанных здесь, являются при условии большого количества вариаций, и многие форматы известны в Рисунки. Вышеприведенные описания приведены только в качестве руководства и одного из следующих примеров: навык в данной области техники позволяет легко модифицировать описанные протоколы, используя приемы хорошо известны в искусстве.

[1035] один ампликон 302nt вируса SARS известен как "BNI-1" (SEQ ID NO: 9927). Он был секвенирован в Институте Бернхарда Нохта, Гамбург, Германия. В апреле 2003 года была опубликована последовательность BNI-1 по ВОЗ сайт (<http://www.who.int/csr/sars/primers/en/>) и в Dorsten et al., "Идентификация нового коронавируса у пациентов с тяжелой острой формой заболевания Респираторный синдром", New England Journal of Medicine, опубликовано на сайте At <http://www.nejm.org>. обе ссылки включены в настоящем документе путем ссылка в полном объеме. Некоторые варианты осуществления изобретения не имеют включает в себя нуклеиновую кислоту, состоящую из SEQ ID NO: 9927. Некоторые другие варианты осуществления изобретения не включают нуклеиновую кислоту, содержащую SEQ ID NO: 9927. Некоторые варианты осуществления изобретения не охватывают а полипептид, состоящий из любого из SEQ ID NO.отхлебывать.S: 9928 - 9959. Некоторые другие варианты осуществления изобретения не включают нуклеиновую кислоту включая любой из SEQ ID NOs: от 9928 до 9959. Некоторые варианты реализации изобретение не подлежат этим исключениям.

Иммуноанализы

[1036] настоящее изобретение использует различные методы иммуноанализа для идентификация лиц, подвергшихся воздействию SARSV и / или биологических образцов содержащие антигены SARSV или антитела к SARSV.

Форматы Иммуноанализа

[1037] антигены SARSV могут быть использованы практически в любом формате анализа это использует известный антиген для обнаружения антител. Общая черта: все эти анализы заключаются в том, что антиген контактирует с биологическими образец, подозреваемый в содержании антител к SARSV в условиях, которые разрешить антигену связываться с любым таким антителом, присутствующим в компоненте. Такими условиями, как правило, будут физиологические температура, pH и ионный сила, использующая избыток антигена. Инкубация данного антигена с образец сопровождается обнаружением иммунных комплексов, состоящих из антиген. Альтернативно, анти -- SARSV антитела могут быть использованы к определить наличие антигенов SARSV в биологическом образце. Сочетание анализы на антиген / антитела также рассматриваются; например, как описано для обнаружения HCV в патенте США 6,630,298.

[1038] дизайн иммуноанализов подвергается большому количеству вариация, и многие форматы известны в искусстве. Протоколы могут, например: например, используйте твердые опоры или иммунопреципитацию. Большинство анализов включают в себя польза обозначенных антитела или полипептида; ярлыки могут быть, для пример, ферментативный, дневной, хемилюминесцентный, радиоактивный, или краска молекулы. Анализы, которые усиливают сигналы от иммунного комплекса являются также известный; примеры чего анализы которые используют биотин и авидин, и энзим-обозначенные и посредничанные immunoassays, как assays ELISA.

[1039] иммуноферментный анализ может быть, без ограничения, в гетерогенном или в однородном формате, а также стандартного или конкурентного типа. В а гетерогенный формат, полипептид типично прыгнут к твердому телу матрица или поддержка для того чтобы облегчить разъединение образца от полипептид после инкубации. Примеры твердых опор, которые можно использовать являются нитроцеллюлозными (например, в мембранной или микротиттерной форме), поливинилхлорид (например, в листах или микротиттерных лунках), полистирольный латекс (например, в шариках или микротиттерных пластинках, поливинилиденфторид, диазотированная бумага, нейлоновые мембраны, микрочипы, биочипы высокой или низкой плотности, рекомбинантные иммуноферментный анализ (Риба), приборы для определения микрожидкости, микромагнитные шарики, активированные шарики, и шарики протеина А. Например, Dynatech Immunon или Immunon 2 пластины микротиттера или 0,25-дюймовые полистирольные шарики (точность Пластиковый шарик) можно использовать в неоднородном формате. Прочная поддержка содержащий антигенный полипептид обычно промывают после того, как отделить его от образца испытания, и до обнаружения связанного антитела. В искусстве известны как стандартные, так и конкурентные форматы.

[1040] в однородном формате, образец теста инкубирован с сочетание антигенов в растворе. Например, это может быть ниже условия которые осаждают любые комплексы антиген-антитела которые сформированный. Известны как стандартные, так и конкурентные форматы для этих анализов в искусстве.

[1041] в стандартном формате, количество антител SARSV в антитело-антигенные комплексы непосредственно контролируются. Это может быть так выполненный путем определять ли обозначенный anti-xenogeneic (например, антигуманные) антитела, распознающие эпитоп на анти-SARSV антитела будут связываться из-за образования комплекса. В конкурентном формате, количество антител SARSV в образце выведено путем контролировать конкурентное влияние на связывание известного количества меченых антител (или другой конкурирующий лиганд) в комплексе.

[1042] образующиеся комплексы, содержащие антитело против SARSV (или в случае конкурентные анализы, количество конкурирующих антител) выявляются любыми из ряда известных приемов, в зависимости от формата. Например, немаркированные антитела SARSV в комплексе могут быть обнаружены с помощью конъюгат антиксеногенного Ig, комплексированного с меткой, например, ферментом этикетка).

[1043] в формате иммунопреципитационного или агглютинационного анализа реакция между антигенами SARSV и антителом образует сеть, которая осаждается из раствора или суспензии и образует видимый слой или пленка осадка. Если анти-SARSV антитела не присутствуют в тесте образец, никакой видимый осадок не сформирован.

[1044] существует по меньшей мере три специфических типа агглютинации частиц (ПА) анализы. Эти анализы использованы для обнаружения антител к различные антигены покрыванный к поддержке. Одним из видов этого анализа является способ определения гемагглютинации с использованием сенсibilizированных эритроцитов (РБК) путем пассивной адсорбции антигена (или антитела) на РБК. Добавление: специфические антигенные антитела,

присутствующие в компоненте организма, если таковые имеются, вызывают RBCs покрытый с очищенным антигеном для того чтобы агглютинировать.

[1045] для устранения потенциальных неспецифических реакций в области анализ гемагглютинации, 2 искусственных несущей может быть использован вместо РБК в ПА. Наиболее распространенными из них являются латексные частицы. Однако, частицы желатина также могут быть использованы. Анализ с использованием любого из них носители основаны на пассивном агглютинировании частиц, покрытых оболочкой очищенные антигены.

[1046] антигены SARSV обычно упаковываются в виде набора для использования в этих иммуноанализах. Набор нормально будет содержать в отдельном контейнере нативный антиген SARSV, контрольные составы антител (положительное и / или отрицательное), обозначенное антитело когда формат анализа требует таких же и реагентов сигнала производя (например, субстрата энзима) если метка не генерирует сигнал непосредственно. Родной антиген SARSV может быть уже привязан к твердой матрице или отделен с реагентами для привязка его к матрице. Инструкции (например, записанные, магнитофон, CD-ROM, и т.д.) для проведения анализа обычно будут включены в комплект.

[1047] Иммуноанализы, использующие нативный антиген SARSV, являются дополнительно полезны при скрининге крови для подготовки питания из которых потенциально инфекционный SARSV отсутствует. Метод для проведения подготовка кровоснабжения включает в себя следующие этапы. Реагируя а компонент тела, предпочтительно кровь или компонент крови, от индивидуальная донорская кровь с нативным антигеном SARSV для того чтобы позволить иммунологическая реакция между антителами SARSV, если таковые имеются, и SARSV антиген. Определение наличия комплексов анти-SARSV антитело-SARSV антиген образуются в результате реакции. Кровь внесла свой вклад в кровь поставка осуществляется от доноров, которые не проявляют антител к нативному SARSV антигены.

продукция антител

[1048] как объяснено выше, анализ может использовать различные антитела которые может быть связан с твердой опорой, и что обнаружить антиген или комплексы антиген / антитело, образующиеся при наличии SARSV инфекции в организме человека образец. Эти антитела могут быть поликлональными или моноклональными антителами препараты, моноспецифические антисыворотки, человеческие антитела или могут быть гибридными или химерные антитела, такие как гуманизированные антитела, измененные антитела, F (ab')₂ фрагмента, фрагменты F (ab), фрагменты Fv, однодоменные антитела, конструкции димерных или тримерных фрагментов антител, мини-антитела, или их функциональные фрагменты, которые связываются с данным антигеном.

[1049] антитела получают с использованием методов, хорошо известных тем из них, что: мастерство в этом искусстве раскрывается и в, например, США Пат. № 4011308; 4 722 890; 4 016 043; 3 876 504; 3 770 380 и 4 372 745. Например, поликлональные антитела произведены путем иммунизировать соответствующее животное, такие как мышь, Крыса, Кролик, Овца или коза, с антигеном интереса. В чтобы повысить иммуногенность, антиген можно связать с носителем до начала иммунизации. Такие носители хорошо известны тем из обычных мастерство в этом искусстве. Иммунизация обычно проводится путем смешивания или эмульгирование антигена в физиологическом растворе, предпочтительно в адьюванте, таком как Полный адьювант Фрейнда, и впрыскивать смесь или эмульсию парентерально (обычно подкожно или внутримышечно). Животное есть вообще форсированный 2-6 неделям позже с одними или больше впрысками антиген в физиологическом растворе, предпочтительно с использованием неполного адьюванта Фрейнда. Антитела также могут быть получены путем иммунизации *in vitro*, используя методы известный в этом искусстве. Поликлональная антисыворотка после этого получена от иммунизированное животное.

[1050] моноклональные антитела, как правило, получают с использованием метода Kohler & Milstein (1975) Nature 256:495-497, или их модификация, как описано выше.

[1051] как было объяснено выше, фрагменты антител, которые сохраняют способность к распознают интересующий антиген, также найдете применение в теме иммуноанализы. Ряд фрагментов антитела известны в искусстве, которые содержат антигенсвязывающие сайты, способные проявлять иммунологическую активность связывающие свойства интактной молекулы антитела. Например, функциональные фрагменты антител могут быть получены путем расщепления константы область, не ответственная за связывание антигена, из молекулы антитела, используя, например, пепсин, чтобы произвести F (ab')₂ фрагмента. Такие фрагменты будет содержать два сайта связывания антигена, но не хватает части постоянная область от каждой из тяжелых цепей. Аналогично, при желании, Fab фрагменты, содержащие один сайт связывания антигена, могут быть получены, например, путем переваривания поликлональных или моноклональных антител с папаином. Функциональные фрагменты, включающие только переменные области тяжелых и светлые цепи, можно также произвести, используя стандартные методы как рекомбинантная продукция или предпочтительное протеолитическое расщепление молекулы иммуноглобулина. Эти фрагменты известны как Fv. См., например, Inbar et al. (1972) Proc. Natуральный. Акад. Sci. США 69:2659-2662; Hochman et Аль. (1976) Biochem 15:2706-2710; и Эрлих и др. (1980) Biochem 19:4091-4096.

[1052] одноцепочечный полипептид Fv ("sFv "или" scFv") является ковалентным linked V. sub.H- V. sub.L гетеродимер, который экспрессируется из слияния генов в том числе и V. суб.С - и V. суб.L- кодирующие гены, связанные а пептид-кодирующий линкер. Хьюстон и др. (1988) Proc. Натуральный. Акад. Sci. США 85:5879-5883. Ряд методов были описаны для того чтобы различить и разработка химических структур (линкеры) для преобразования природного газа агрегированные, но химически разделенные легкие и тяжелые полипептидные цепи от зоны антитела V в молекулу sFv которая сложит в а трехмерная структура по существу аналогична структуре Ан антиген-связывающий сайт. Смотрите, например, US Pat. № 5 091 513, 5 132 405 и 4,946,778. Молекулы sFv могут быть получены с использованием методов, описанных в искусство. См., например, Huston et al. (1988) Proc. Натуральный. Акад. Sci. США 85: 5879-5883; U. S. Pat. № 5 091 513, 5 132 405 и 4 946 778. Дизайн критерии включают в себя определение соответствующей длины для покрытия расстояния между С-концом одной цепи и N-концом другой, при этом линкер обычно образуется из мелких гидрофильных аминокислот остатка, которые не склонны свертываться спирально или образовывать вторичные структуры. Такой методы были описаны в разделе искусство. Смотрите, например, US Pat. Nos. 5 091 513, 5 132 405 и 4 946 778. Соответствующие линкеры вообще состоят из полипептидные цепи чередующихся наборов остатков глицина и серина, и сможете включить выпарки глутаминовой кислоты и лизина введенные для того чтобы увеличить растворимость.

[1053] "мини-антитела "или" minibodies " также найдут польза с настоящее изобретение. Minibodies цепи полипептида sFv которые включают Домены олигомеризации на их С-терминах, отделенные от сфв а шарнирная область. Pack et al. (1992) Biochem 31:1579-1584. То домен олигомеризации содержит самоассоциирующиеся а-спирали, например, лейциновые молнии, которые могут быть дополнительно стабилизированы дополнительным дисульфидом узы. Домен олигомеризации сконструирован таким образом, чтобы быть совместимым с векторная складчатость через мембрану, мысль процесса для того чтобы облегчить внутри складчатость *in vivo* полипептида в функциональный связывающий сайт. Как правило, мини-тела могут быть сконструированы с использованием хорошо известных рекомбинантных методов в искусстве. См., например, Pack et al. (1992) Biochem 31: 1579-1584; Cumber et Аль. (1992) J. Иммунология 149B: 120-126.

Производство антигенов SARS

[1054] антигены SARSV, используемые в настоящем изобретении, как правило, являются производятся рекомбинантно. Таким образом, полинуклеотиды, кодирующие антигены SARSV для использования с настоящим изобретением может быть произведено с использованием стандартных методик молекулярная биология. Например, полинуклеотидные последовательности, кодирующие для вышеописанные молекулы могут быть получены с помощью рекомбинантных методов, таких как как при скрининге кднк и геномных библиотек из клеток, экспрессирующих ген, или путем выведения гена из вектора, который, как известно, включает то же самое. Кроме того, нужный ген может быть выделен непосредственно из вирусных нуклеиновых молекулы кислот, используя методы, описанные в этой статье, такие как те описано для HCV в Houghton et al.- Американский Пат. № 5.350.671. Ген кодирование интересующего антигена также может быть произведено синтетически, а не клонировали. Молекулы могут быть сконструированы с соответствующими кодонами для конкретной последовательности (предпочтительно оптимальные кодоны для выражения host of choice). Полная последовательность после этого собрана от перекрывать олигонуклеотиды, полученные стандартными методами и собранные в А полная последовательность кодирования. Смотрите, например, Edge (1981) Nature 292: 756; Nambair и др. (1984) Science 223: 1299; и Jay et al. (1984) J. Biol. Хим.. 259:6311.

[1055] таким образом, определенные нуклеотидные последовательности могут быть получены из векторов укрывающие нужные последовательности или

синтезированные полностью или частично используя различные известные в данной области техники синтеза олигонуклеотидов, такие как сайт-направленный мутагенез и полимеразная цепная реакция (ПЦР) методы, где это уместно. См., например, Sambrook, выше. В частности, один из способов получения нуклеотидных последовательностей, кодирующих искомое последовательности путем отжига комплементарных наборов перекрывающей синтетике олигонуклеотиды, полученные в обычном автоматизированном полинуклеотиде синтезатор, с последующим лигированием соответствующей ДНК-лигазой и амплификация лигированной нуклеотидной последовательности с помощью ПЦР. См., например; Jayaraman et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. США 88: 4084-4088. Кроме того, олигонуклеотидный направленный синтез (Jones et al. (1986) Nature 54: 75-82), олигонуклеотидный направленный мутагенез ранее существовавших нуклеотидные области (Riechmann et al. (1988) Nature 332: 323-327 и Verhoeven et al. (1988) наука 239:1534-1536), и ферментативный заполнять-внутри гапированных олигонуклеотидов с использованием T4 ДНК-полимеразы (Queen et al. (1989) Процесс. Натл. Акад. Sci. США 86:10029-10033) можно использовать под изобретение предназначено для получения молекул, имеющих измененное или усиленное антигенсвязывающее действие возможности, и / или уменьшенная иммуногенность.

[1056] после того, как кодирующие последовательности были подготовлены или изолированы, такие последовательности могут быть клонированы в любой подходящий вектор или репликон. Многочисленный клонирование векторов известны те из мастерства в искусстве, и выбор выбор подходящего вектора клонирования является вопросом выбора. Подходящие векторы включают, но не ограничиваются этим, плазмиды, фаги, транспозоны, космиды, хромосомы (включая искусственные хромосомы, такие как BACs или YACs) или вирусы, которые способны к репликации, когда связаны с правильными органами управления.

[1057] кодирующая последовательность затем помещается под контроль подходящего элементы управления, в зависимости от системы, которая будет использоваться для выражения. Таким образом, кодирующая последовательность может быть помещена под контроль промотора, сайт связывания рибосомы (для бактериальной экспрессии), и необязательно, Ан оператор, так что последовательность ДНК, представляющая интерес, транскрибируется в РНК с помощью подходящей трансфермант. Кодирующая последовательности может содержать или не содержать сигнальный пептид или последовательность лидера, которые позже могут быть удалены хозяином в постпереходной обработке. Смотрите, например, US Pat. № 4.431.739; 4,425,437; 4,338,397.

[1058] в дополнение к управляющим последовательностям, возможно, будет желательно добавить регуляторные последовательности, которые позволяют регулировать выражение последовательности относительно роста клетки-хозяина. Регуляторные последовательности известны те из мастерства в этом искусстве, и примеры включают в себя те, которые вызвать экспрессию гена, который будет включен или выключен в ответ на а химический или физический стимул, в том числе наличие регуляторного фактора соединение. Другие типы регулирующих элементов также могут присутствовать в вектор. Например, элементы усилителя могут быть использованы здесь для увеличения уровни выражения конструкций. Примеры включают ранний ген SV40 enhancer (Dijkema et al. (1985) EMBO J 4:761), усилитель / промотор производный от длинного терминального повтора (LTR) вируса саркомы Rous (Gorman et al. (1982) Proc. Natl. Акад. Sci. США 79:6777) и элементы полученный из ЦМВ человека (Boshart et al. (1985) ячейка 41:521), например: элементы, включенные в последовательность CMV Интрон А (U. S. Pat. № 5.688.688). Кассета выражений может дополнительно включать источник репликации для автономная репликация в подходящей ячейке хоста, одна или несколько выбираемых маркеры, один или несколько сайтов ограничения, потенциальный высокий номер копии и сильный промоутер.

[1059] вектор выражения строится так, что конкретное кодирование последовательность располагается в векторе с соответствующим регулятором последовательности, позиционирование и ориентация кодирующей последовательности с помощью уважение к управляющим последовательностям таково, что последовательность кодирования является транскрибируется под "контролем" управляющих последовательностей (т. е. РНК полимеразы, связывающаяся с молекулой ДНК в контрольных последовательностях расшифровывает последовательность кодирования). Модификация кодирования последовательностей молекула интереса может быть желательна для достижения этой цели. Для например, в некоторых случаях может потребоваться изменить последовательность так, чтобы его можно прикрепить к управляющим последовательностям в соответствующем ориентация; т. е. для поддержания рамки чтения. Управляющая последовательность и другие регулирующие последовательности могут быть связаны с кодирующей последовательностью перед вставкой в вектор. Кроме того, последовательность кодирования может быть клонированным непосредственно в вектор выражения, который уже содержит управляющие последовательности и соответствующий сайт ограничения.

[1060] как было объяснено выше, может быть также желательно производить мутантов или аналоги интересующего антигена. Описаны способы для этого: например, у Дасмахатры и др. - Американский Пат. № 5.843.752 и Чжан и др., Американский Пат. № 5 990 276. Мутанты или аналоги белков SARSV для использования в предметные анализы могут быть подготовлены путем удаления части последовательность, кодирующая интересующий полипептид, путем введения а последовательности, и / или путем замены одного или нескольких нуклеотидов в пределах последовательности. Способы модификации нуклеотидных последовательностей, таких как сайт-направленный мутагенез и тому подобное хорошо известны специалистам в искусстве. См., например, Sambrook et al., выше; Kunkel, T. A. (1985) Proc. Natl. Акад. Sci. США (1985) 82:448; Гейссельс и др. (1987) BioTechniques 5: 786; Zoller & Smith (1983) Methods Enzymol. 100:468; Dalbie-McFarland et al. (1982) Proc. Natl. Акад. Sci USA 79: 6409.

[1061] молекулы могут быть выражены в самых разнообразных системах, включая насекомое, млекопитающее, бактериальное, вирусное и дрожжевое выражение системы, все хорошо известные в искусстве.

[1062] например, системы экспрессии клеток насекомых, такие как бакуловирус системы, известные к тем из искусства искусства и описанные внутри, например, Саммерс И Смит, Техасская Сельскохозяйственная Экспериментальная Станция Бюллетень № 1555 (1987). Материалы и способы для экспрессии клеток бакуловируса/насекомого системы доступны на рынке в форме комплекта от, в частности, Invitrogen, San Diego Calif. (Комплект "MaxVac"). Аналогично, бактериальные и системы экспрессии клеток млекопитающих хорошо известны в искусстве и описаны в, например, Sambrook et al., выше. Также известны системы экспрессии дрожжей в данной области техники и описаны, например, в геномной инженерии дрожжей (Bagt et Аль., ЭЦП., 1989) Баттеруортс, Лондон.

[1063] ряд подходящих клеток хозяина для использования с вышеуказанными системами также известны такие случаи. Например, линии клеток млекопитающих известны в искусстве и включают бессмертные клеточные линии, доступные из американского типа Коллекция культуры (ATCC), например, но не ограничиваясь этим, китайский хомяк клетки яичника (CHO), клетки HeLa, клетки почки хомячка младенца (ВНК), обезьяна клетки почек (COS), эмбриональные клетки почек человека, гепатоцеллюлярные клетки человека клетки карциномы (например, гепатит G2), клетки почки madin-Darby bovine ("MDBK"), так же как и другие. Точно так же бактериальные хозяева, такие как E. coli, бациллы subtilis и Streptococcus spp., находят применение и с настоящим конструкции выражений. Дрожжевые хозяева полезны в настоящем изобретении включают в себя, в частности, Saccharomyces cerevisiae, Candida albicans, Candida maltosa, hansenua polymorpha, Kluyveromyces fragilis, Kluyveromyces lactis, Pichia guilliermondii, Pichia pastoris, Schizosaccharomyces pombe и Yarrowia lipolytica. Клетки насекомых для использования с экспрессией бакуловируса к векторам относятся, в частности, Aedes aegypti, Autographa californica, Bombyx mori, Drosophila melanogaster, Spodoptera frugiperda, и Trichoplusia ni.

[1064] молекулы нуклеиновых кислот, содержащие нуклеотидные последовательности, представляющие интерес может быть стабильно интегрирован в геном клетки-хозяина или поддерживаться на а стабильный эписомный элемент в подходящей клетке хозяина с использованием различных генов техника доставки хорошо известна в искусстве. Смотрите, например, US Pat. Нет. 5,399,346.

[1065] в зависимости от выбранной системы выражений и хоста, то молекулы произведены путем расти клетки хозяина преобразованные выражением вектор описан выше в условиях, при которых белок экспрессируется. Выраженный белок затем выделяют из клеток хозяина и очищают. Если экспрессионная система выделяет белок в питательную среду, то продукт можно очистить сразу от средств массовой информации. Если он не секретируется, его можно выделить из лизатов клеток. Выбор соответствующего объекта условия роста и методы восстановления находятся в пределах мастерства этого искусства.

ПРИМЕР

[1066] для полезной экспрессии антигенов SARSV в Сахаромицетах cerevisiae и Pichia pastoris, клетки насекомых и клетки млекопитающих, the следующие Домены клонируются в векторы выражений, как указано в Таблица ниже. Порядковые номера nt являются из последовательности SARSV

SEQ ID NO: 1. [1067] РНК-полимераза 1a: SARS nt 250-13398 [1068] РНК полимеразы 1b: SARS nt 13399-21470 [1069] ORFns.конверт (гомологичный к ns2, гликопротеин оболочки гематтотинин-эстеразы и Спайк гликопротеин): SARS nt 21477-25244 [1070] мембрана: SARS nt 27849-28103 [1071] нуклеокапсид: SARS nt 28105-29373

[1072] комбинация ПЦР и синтетических олигонуклеотидов используется для создания вышеуказанные домены с ограничениями сайтов адаптированы к следующему выражению векторные иллюстрации: ТАБЛИЦА-US-00046 Ограничение заканчивается векторным промотором экспрессии хозяина HindIII / SalI pBS24. 1 ADH2 / GAPDH AD3 / Saccharomyces EcoRI / SalI \ \ pBS24. 1 ADH2 / GAPDH / SOD fusion AD3 / Saccharomyces XbaI / SalI pAO815 AOX1 GS115 / Pichia pastoris HVK-293 / переходный процесс EcoRI / BamHI pCMVkm2 CMVp/Enhancer / интронная трансфекция Линия клетки EcoRI/XmaI pCMVIII CMVp/Улучшителя/интроны cho стабилизированная Клеточные линии, используемые Хирином Nhei / SalI pBluVac4.5 Полиэдрин включает: Sf9, Sf21, Tn5

IV. лечение инфекции ОРВИ с помощью RNAi

[1073] интерференция РНК или "RNAi" - это термин, первоначально придуманный огнем и сотрудники описывают наблюдение, что двухцепочечная РНК (dsRNA) может блокировать экспрессию генов, когда он вводится в червей (Fire et al., Nature 391, 806-811 (1998)). RNAi, скорее всего, включает деградацию мРНК, приводя к в последовательность-специфическом, посттранскрипционном гене заставляя замолчать внутри многие организмы. RNAi-это посттранскрипционный процесс, инициируемый введение двухцепочечной РНК, которая приводит к глушению гена в а последовательность-специфический способ. Было сообщено, что происходит RNAi естественно внутри организмы столь же разнообразны, как нематоды, трипаномы, растения и грибы. Это больше всего вероятно служит для защиты организмов от вирусов, модуляции транспозонов активность и устранение aberrантных продуктов транскрипции.

[1074] первое доказательство того, что dsRNA может достичь эффективного гена глушение через RNAi пришло из исследований по нематоде *Caenorhabditis elegans* (огонь и др. (1998) Nature, 391:806-811 and U. S. Pat. Нет. 6,506,559). Более поздние исследования у плодовой мухи *Drosophila melanogaster* продемонстрировано, что RNAi является двухступенчатым механизмом (Elbashir et al. (2001) Гены Дев., 15(2): 188-200). Во-первых, длинные дсрнк расщепляются ферментом известный как Dicer в 21-23 фрагментах нуклеотидов (nt), называемых малыми интерферирующей РНК (siRNAs). Затем, siRNAs ассоциируются с рибонуклеазой комплекс (называемый RISC для РНК индуцированного комплекса глушения), который нацелен на это комплекс для комплементарных мРНК. Затем RISC расщепляет целевые мРНК напротив комплементарной siRNA, которая делает mRNA впечатлительным к другие пути деградации РНК.

[1075] RNAi-это явление, когда dsRNA соответствует целевой ДНК или последовательность РНК может подавлять или подавлять экспрессию генов. Даже не смотря на дсрнк может опосредовать геноспецифическую интерференцию в клетках млекопитающих в некоторых случаях обстоятельства (Wianny & Zernicka-Goetz (2000) Nature Cell Biol. 2:70-75; Свобода и др. (2000) разработка 17:4147-4156) использование RNAi в соматические клетки млекопитающих часто ограничены из-за срабатывания dsRNA dsRNA-зависимая протеинкиназа (PKR), которая в свою очередь инактивирует фактор трансляции eIF2a и вызывает генерализованное подавление белка синтез и часто времена апоптоз (Гил & Эстебан (2000) апоптоз 5:107-114).

[1076] недавно, ген-специфическое подавление используя сирну приблизительно 21 или 22 пары оснований по длине, соответствующие целевой РНК или ДНК были показаны, что нарушают последовательности выражение этих пристреленных последовательности в клетках млекопитающих (Elbashir, S. M., et al., Nature 411: 494-498 (2001)). Однако не ясно, что все последовательности РНК или ДНК из генома клетки млекопитающего чувствительны к siRNA. Это также является неуверенно, что каждый тип клеток млекопитающих обладает необходимым механизмом для осуществления геноспецифического подавления с использованием siRNA. В дальнейшем, Сирна имеет ограниченное применение по меньшей мере по двум причинам: переходящий характер эффект подавления наблюдается в клетках, где была обнаружена Сирна вводится; и в некоторых случаях необходимость химического синтеза сирен перед их использованием (Tuschl T., Nature Biotechnol., 20: 446-448 (2002)). Кроме того, нестабильность этих коротких синтетических РНК делает его представляет проблемы для любого долгосрочного использования этих siRNAs a pharmaceutical.

[1077] чтобы преодолеть это ограничение, настоящее изобретение обеспечивает модифицированная Сирна с повышенной стабильностью против деградации нуклеазы при сохранении своей способности ингибировать вирусную репликацию через РНК вмешательство. Такая модификация рибонуклеотидов в составе siRNAs, добавляет химическую группу через химический синтез или in vitro транскрипцию или более длинные модифицированные РНК могут быть получены любым из этих методов и разрезаны в сирны с помощью Dicer.

[1078] хотя другие методы для ген-специфического подавления использовали химически модифицированные нуклеиновые кислоты, такие как антисмысл и рибозим технология, такая модификация разрушает критические ферментативные активности необходимые для функционирования этих технологий. В отношении антисмысла технология модификации рибонуклеотидов разрушает активность РНК, тогда как такая модификация упраздняет каталитическую активность рибозимов.

[1079] настоящее изобретение обеспечивает получение двухцепочечной РНК (dsRNA) модифицированная молекула для защиты от нуклеазной деградации с а длина от около 10 до около 30 нуклеотидов, которые способны инактивировать вирус в клетке млекопитающего. Изобретение также предусматривает способ получения инактивация вируса путем введения модифицированных малых интерферирующих РНК (siRNAs) которые доработаны так, что они будут нуклеазой или рнказой упорными и сохранят биологическую деятельность мочь заблокировать вирусное репликация путем нацеливания последовательности РНК в вирусе.

[1080] изобретение дополнительно направлено на способ получения модифицированной формы сирны, которые нацелены на последовательность РНК в вирусе, содержащем получение а модифицированный-двухцепочечный фрагмент РНК (dsRNA), содержащий по меньшей мере один модифицированный рибонуклеотид по крайней мере в одной нити, которая охватывает геном человека. вирус; и расщепление модифицированных фрагментов dsRNA с помощью рекомбинантных людской Dicer приводя к в больше чем одной доработанной siRNA.

[1081] настоящее изобретение представляет собой модифицированную молекулу дсрнк из примерно от 10 до 30 нуклеотидов, которые опосредуют целевую РНК-интерференцию в печени или при ОРВИ-инфицированные клетки.

[1082] как использовано здесь взаимодействие РНК, или RNAi, использовано для того чтобы значить специфичное к последовательности, или специфичное к гену, подавление экспрессии генов (синтез протеина), без причинять обобщенное подавление протеина синтез в клетках, укрывающих сирну. Изобретением не ограничивается а частная теория механизма действия Рнаи. Например, RNAi может включать деградацию мессенджерной РНК (мРНК) в индуцированной РНК комплекс глушения (RISC), претовращающий перевод транскрибированной мРНК, или оно может включать метилирование геномной ДНК, шунтирование транскрипции о самом гене. Недостаток экспрессии генов, вызванных RNAi, может быть преходящим, продолжая короткий период времени, или он может быть стабилизирован, или постоянн, длящийся неопределенный период времени.

[1083] под термином РНК подразумевается то, что признано в данной статье. Далее, как используемый здесь, РНК используется для обозначения двухцепочечной РНК (dsRNA) или одноцепочечная РНК (ssRNA) или dsRNA с одноцепочечным выступом. dsRNAs-по смыслу настоящего изобретения включает в себя короткие интерферирующая РНК (siRNA), микро-РНК (miRNA) и малая шпильковая РНК (shRNA), Кроме того, РНК также используется для обозначения мессенджерной РНК (мРНК), трансферной РНК (тРНК) или рибосомальная РНК (рРНК).

[1084] настоящее изобретение направлено на малую интерферирующую РНК (siRNA) которые были химически доработаны для того чтобы посовещаться увеличенная стабильность против деградация нуклеазы, однако эти сирены все еще способны связываться с мишенью РНК, которые могут присутствовать в клетках. В том случае, когда целевая РНК находится специфичная РНК вируса, модифицированные siRNAs способны связываться с вирусом специфические РНК и инактивируют вирус. Модифицированная Сирна настоящего времени изобретение содержит модифицированный рибонуклеотид, в котором siRNA является устойчивый к ферментативному ухудшению, как ухудшение РНКазы, и все же сохраняет способность подавлять вирусную репликацию. Модифицированная Сирна-это более конкретно модифицированный в положении 2' рибозы в сирне. Модификация находится в 2' положении по крайней мере одного рибонуклеотида из группы: - сказала Сирна. Присоединение рецептор-связывающих лигандов к молекулам siRNA

может использоваться для таргетинга siRNA на нужный тип чячек. Например, присоединение холестерина к 5'-концу или 3' - концу молекулы siRNA, для того чтобы дать cholesteryl siRNA, сможете увеличить пристреливать к гепатоцитам. Прочее лиганды для опосредованного рецептором таргетирования siRNA на печень включают HBV поверхностный антиген, ЛППП и др.

[1085] более конкретно, siRNA модифицируется по крайней мере один пиримидин, по крайней мере один Пурин или их комбинация. Однако, вообще все пиримидины, или все пурины или комбинация всех пиримидины и все пурины сирны модифицированы. Более предпочтительно, пиримидины доработаны и эти пиримидины цитозин, а производное цитозина, урацил, производное урацила или их комбинация из этого. Также предполагается модифицировать выделенные рибонуклеотиды по крайней мере, в одной пряди сирны или рибонуклеотидов в обоих случаях пряди сирны видоизменяются.

[1086] нуклеотиды, содержащие пиримидиновые основания, обнаруженные в РНК (цитидин и uridine) можно химически доработать путем добавлять любую молекулу то ингибирует деградацию или разрушение РНК до 2' Положения рибозы молекула. 2' - доработанный нуклеотид пиримидина можно сформировать используя а количество различных методов. 2' модификация совещается увеличенный стабильность к siRNA путем делать siRNA непроницаемым или упорным к активность нуклеазы. Таким образом, 2' модифицированная Сирна имеет более длинную сыворотку период полураспада и устойчив к деградации по сравнению с немодифицированной сирной. Сирна также может быть изменена полностью или частично.

[1087] в отношении химической модификации siRNAs, молекулы из галоидная химическая группа предпочтительно добавлена к рибонуклеотиду - Сирна. Внутри галоиды, фтор предпочитаемая молекула но другие химические молекулы, помимо фтор -, таких как метил-, метоксэтил-и пропил-изменения могут также мы сделали. Но это не так. предпочтительной модификацией является фтор-модификация, такая как а 2' - фтормодификация или 2', 2' - фтормодификация. Таким образом, в предпочтительном вариант осуществления изобретения: Сирна модифицируется путем добавления фтора молекула к 2' углероду рибонуклеотида пиримидина. The siRNA may быть полностью или частично фторированным. Например, только цитозин нуклеотиды должны быть фторированы. В качестве альтернативы, только uracil нуклеотид нужно фторировать но и урацил и цитозин могут быть фторированный. Кроме того, только одна нить, либо смысл, либо антисмысл, из них: Сирна может быть фторирована. Даже частичное 2' фторирование Сирна дает защиту от нуклеолитической деградации. Кроме того, это так важно отметить, что 2' фторированная Сирна не токсична для клеток, а неожиданный результат учитывая что химия фтора обычно токсична к живой организм.

[1088] Сирна настоящего изобретения предназначена для взаимодействия с а целевая нуклеотидная последовательность. Наиболее предпочтительно этот целевой нуклеотид последовательность-это болезнь, продуцирующая агент или патоген, о котором человек хочет знать. подавляют экспрессию генов. Более предпочтительно, это целевая нуклеотидная последовательность находится в геноме вируса, и далее этот геном вируса от вируса РНК или ДНК-вирус выбирается из группы, состоящей из вируса гепатита С (HCV), вирус гепатита А, вирус гепатита В, вирус гепатита D, гепатит Е вирус, Вирус Эбола, вирус гриппа, ротавирус, реовирус, ретровирус, полиовирус, вирус папилломы человека (ВПЧ), метапневмовирус и коронавирусы. Наиболее предпочтительным вирусом является вирус ОРВИ.

[1089] модифицированная Сирна может быть приготовлена несколькими способами, такими как: химический синтез, транскрипция полимеразы Т7, или путем обрабатывать доработанный длинная двухцепочечная РНК (dsRNA), полученная одним из двух предыдущих вариантов метода с ферментом Dicer. Фермент Dicer может быть использован для расщепления dsRNA, что это около 500 пар оснований для около 1000 пар оснований в размере, чтобы создать смешанные популяции dsRNA от приблизительно 21 до приблизительно 23 пар оснований в длина. Кроме того, неожиданный результат использования фермента Dicer способ заключается в том, что фермент Dicer будет расщеплять модифицированные нити dsRNA, такие как как 2' фторированная модифицированная dsrnc. Перед разработкой этого метода, он ранее считалось, что Dicer не сможет расколоть модифицированный - Сирна. Метод Dicer может быть выполнен с использованием Dicer siRNA Набор поколения доступный от систем генной терапии, Сан-Диего, Калифорния.

[1090] как использовано здесь, малая мешая РНК (siRNA) определена как двух - или одноцепочечная РНК размером от примерно 10 до примерно 30 нуклеотидов по длине, более предпочтительно 12-28 нуклеотидов, более предпочтительно 15-25 нуклеотиды, еще более предпочтительно 19-23 нуклеотидов и наиболее предпочтительно 21-23 нуклеотидов. Длина сирны, используемой в настоящем документе, определяется по формуле: длина одной из нитей РНК. Например, Сирна, которая является описанный как 21 нуклеотид длиной (а 21-mer) может содержать два противоположных пряди РНК, которые отжигают вместе для 19 смежных пар оснований. То два оставшихся нуклеотида на одном конце молекулы не будут отжигать, чтобы противоположная нить, таким образом создавая "свес". Свисяние может быть на 5' или 3' конец dsRNA. Предпочтительно, свес находится на 3' конец цепочки РНК. Длина двухцепочечной РНК, где два противоположные пряди не одинаковой длины будут обозначены более длинными из этих двух нитей. Например, dsRNA, содержащая одну нить, которая является 21 нуклеотид длиной и отжигает к противоположной Стренге которая 20 нуклеотиды длинные, будут рассмотрены, как использовано здесь, 21-мер.

[1091] предпочтительно, чтобы Сирна настоящего изобретения содержала 3' свисяние около 2 до 4 оснований. Более предпочтительно, 3' свисает 2 нуклеотиды длинные. Еще более предпочтительно, чтобы 2 нуклеотида, входящие в состав 3' свисают uridine (U).

[1092] в одном варианте осуществления изобретение обеспечивает молекулу РНК содержит нуклеотидную последовательность, по меньшей мере, на 80% идентичную нуклеотидную последовательность целевого агента или вируса. Предпочтительно, молекула РНК из настоящее изобретение является по меньшей мере 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична нуклеотидной последовательности целевого агента или вируса.

[1093] как практический вопрос, есть ли какая-либо конкретная нуклеиновая кислота молекула это как минимум 90%, 95%, 96%, 97% 98%, 99% или 100% идентичное к нуклеотидная последовательность целевого агента или вируса может быть определена условно используя известные компьютерные программы, такие как программа Bestfit (Висконсинский пакет анализа последовательности, версия 8 для Unix, генетика Компьютерная Группа, Университетский Исследовательский Парк, 575 Science Drive, Madison, ИСВ. 53711). Bestfit использует алгоритм локальной гомологии Смита & Уотерман (успехи в прикладной математике 2: 482-489 (1981)), чтобы найти лучший сегмент гомологии между двумя последовательностями. При использовании Bestfit или любого другая программа выравнивания последовательности для того чтобы определить ли определенный последовательность, например, на 95% идентична эталонной последовательности согласно настоящему изобретению, параметры задаются, конечно же, таким образом, что процент идентичности рассчитывается по всей длине референтной нуклеотидной последовательности и что разрывы в гомологиях до 5% от общего количества нуклеотидов в референсной последовательности составляют: разрешено.

[1094] настоящее изобретение обеспечивает способ инактивации мишени агент или предпочтительно вирус в пациенте, содержащий введение в организм больного пациент а модифицированная Сирна в эффективном количестве для инактивации целевой агент или вирус. РНК-интерференция по отношению к целевому сегменту ДНК в клетке можно достигнуть путем вводить молекулу dsRNA или siRNA к клетки, где нуклеотидная последовательность молекулы dsRNA соответствует нуклеотидной последовательности целевого сегмента ДНК. Предпочтительно, молекула РНК, используемая для индуцирования целевого RNAi, является siRNA.

[1095] подавление генов, направленное подавление, специфичное к последовательности подавление, пристрелный RNAi или последовательность-специфический RNAi использованы в данном случае это взаимозаменяемо. Кроме того, специфичное для последовательности подавление, как использованный здесь, определяет отдельно анализировать уровни белок, предназначенный для подавления в клетках, содержащих сирну (экспериментальные клетки) и в клетках, не содержащих идентичную siRNA (контрольные ячейки), и сравнение двух значений. Кроме того, экспериментальные и контрольные клетки должны быть получены из одного и того же источника и то же самое животное. Например, контрольные и экспериментальные клетки могут быть, но не ограничиваются, нормальные клетки печени человека как культуры клеток in vitro, или они могут быть получены из гепатоцеллюлярной карциномы. Более потом, управление и экспериментальные клетки, используемые для определения уровня или количества гена подавление должно анализироваться при сходных, если не идентичных, условиях.

[1096] как использовано здесь фраза "пристрелный этап ДНК" использована для того чтобы значить а Последовательность ДНК, кодирующая, полностью или частично, мРНК для целевого объекта протеин, включая интроны или экзоны, где подавление пожелано. ДНК сегмент может также означать последовательность ДНК, которая обычно регулирует экспрессию пристрелного протеина, включая но не ограниченный к промотеру целевой

белок. Кроме того, сегмент ДНК может быть или не быть частью генома клетки или она может быть экстрахромосомной, например плазмидной ДНК.

[1097] настоящее изобретение дополнительно направлено на инактивацию вируса в пациенте, включающем введение пациенту модифицированной сирны в виде эффективное количество для инактивации вируса. Сирна предпочтительно около От 10 до примерно 30 нуклеотидов в длину, более предпочтительно 12-28 нуклеотидов, более предпочтительно 15-25 нуклеотидов, еще более предпочтительно 19-23 нуклеотидов и наиболее предпочтительно 21-23 нуклеотидов. Метод предпочтительно использует а 2 'модифицированная Сирна, которая модифицируется в положении 2' по крайней мере одного рибонуклеотид указанной сирны. Этот метод использует сирну, которая является модифицированный химическими группами, выбранными из группы, состоящей из фтор-, метил -, метоксиэтил-и пропил-модификация. То предпочтительно фтормодификация и либо 2 ' -фтормодификация, либо а 2', 2' -фтормодификация полезна в настоящем изобретении и предпочтительный.

[1098] изменение может быть на пиримидинах, пуринах или А сочетание из siRNA доработано. Более предпочтительно то пиримидины модифицированы, такие как цитозин, производное цитозина, урацил, производное урацила или их комбинация. Одновременно вариант осуществления, по крайней мере, одна нить сирны содержит по крайней мере одну нить сирны, которая содержит одну нить сирны. модифицированный нуклеотид и в альтернативном варианте осуществления, отх пряди Сирна содержит по меньшей мере один модифицированный нуклеотид.

[1099] метод предназначен для таргетирования возбудителей заболеваний или патогены, а точнее вирусы, которые могут быть либо РНК-вирусом или ДНК-вирус, которые выбираются из группы, состоящей из гепатита Вирус С (HCV), вирус гепатита А, вирус гепатита В, вирус гепатита D, вирус гепатита Е, вирус Эбола, вирус гриппа, ротавирус, реовирус, ретровирус, полиовирус, вирус папилломы человека (ВПЧ), метапневмовирус и коронавирусы. Более предпочтительным целевым вирусом является вирус SARS. То в настоящем методе используется Сирна, полученная путем (а) идентификации цели последовательность нуклеотидов в геноме вируса, предпочтительно вируса ОРВИ, для проектирование малой интерферирующей РНК (siRNA); и (b) производство siRNA, которая была модифицирована, чтобы содержать по крайней мере один модифицированный нуклеотид. Еще предпочтительно, чтобы siRNA включала молекулу dsRNA с первой нитью рибонуклеотидная последовательность, соответствующая нуклеотидной последовательности соответствующая целевой нуклеотидной последовательности в указанном вирусе и вторая нить, содержащая рибонуклеотидную последовательность, комплементарную указанной мишени последовательность нуклеотидов, в которой упомянутые первая и вторая нити являются отдельными комплементарные нити, которые скрещиваются друг с другом, чтобы сформировать упомянутую dsRNA молекула, и далее где первая нить рибонуклеотидная последовательность, вторая нить рибонуклеотидной последовательности или как первая, так и вторая нить рибонуклеотидных последовательностей содержит по меньшей мере один модифицированный нуклеотид. В этом методе целевая нуклеотидная последовательность содержит сохраненную последовательность нуклеотидов, необходимая для репликации вируса атипичной пневмонии, и сохраненная нуклеотидная последовательность выбирается из группы, состоящей из SEQ ID NO: 7292, SEQ ID NO: 7293, SEQ ID NO: 7294, SEQ ID NO: 7295, SEQ ID NO: 7296, SEQ ID NO: 7297, SEQ ID NO: 7298, SEQ ID NO: 7299, SEQ ID Нет: 7300 и SEQ ID нет: 7301. Предпочтительно, последовательность нуклеотидов является выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NO: 7292 и SEQ ID NO: 7293. Еще более предпочтительной последовательностью нуклеотидов является SEQ ID NO: 7293.

[1100] Сирна раскрытая в этом применении может быть подготовлена с модифицированные рибонуклеотиды, как описано здесь. Кроме того, модифицированный рибонуклеотид сирны, используемый в настоящем способе, инкорпорирован в указанную сирну путем химического синтеза или ферментативного синтеза.

[1101] siRNA, раскрытая в этом приложении, может иметь или не иметь 5' трифосфатная группа.

[1102] модифицированная Сирна вводится пациенту по методу выбирается из группы, состоящей из внутривенного введения, подкожного впрыска, устная поставка, и поставка липосомы. Модифицированная Сирна накапливается в органе, ткани или системе организма пациента, которые являются печень, желудочно-кишечный тракт, дыхательные пути, шейка матки или кожа.

[1103] настоящее изобретение также предоставляет способ ингибирования репликация вируса, например вируса ОРВИ, в клетках, положительных на ОРВИ вирус, содержащий трансфицирующие SARS-положительные клетки с вектором, который направляет экспрессию модифицированной сирны, которая специфична для атипичной пневмонии. То клетки оцениваются, чтобы определить, если маркер в клетках был ингибируется модифицированной сирной.

[1104] термин пациент, используемый здесь, может быть животным, предпочтительно а млекопитающее. Более предпочтительным субъектом может быть примат, в том числе и нечеловеческий и люди тоже. Термины субъект и пациент могут использоваться взаимозаменяемо.

[1105] обработка, предусмотренная настоящим изобретением, может быть использована для субъекты с уже существующей вирусной инфекцией, или для субъектов предрасположенности к вирусной инфекции ОРВИ. Кроме того, метод проведения настоящее изобретение может быть использовано для коррекции или компенсации сотовой связи или физиологические аномалии, связанные с приданием восприимчивости к вирусные инфекции у пациентов, и/или для облегчения симптомов вирусного заболевания инфекция в пациентах, или как профилактическая мера в пациентах.

[1106] способ лечения пациента, имеющего вирусную инфекцию, включает в себя: введение составов испытуемым. Как использовано здесь, композиция может означать чистое соединение, агент или вещество или смесь два или более соединений, агентов или веществ. Как использовано здесь, термин агент, вещество или соединение предназначены для обозначения белка, нуклеиновой кислоты, углеводы, липиды, полимеры или небольшие молекулы, такие как лекарственные препараты.

[1107] в одном варианте осуществления настоящего изобретения композиция вводят субъекту фармацевтическую композицию. Более потом, the фармацевтическую композицию можно вводить перорально, назально, парентерально, внутрисистемно, внутривенно, наружно (как путем капли или трансдермальный пластырь), букально, либо в виде орального или назального спрея. То термин "парентеральный", используемый здесь, относится к способам введения которые включают внутривенное, внутримышечное, внутривенное, интратеральное, подкожные и внутрисуставные инъекции и инфузии. То фармацевтические композиции, предусмотренные настоящим изобретением, могут также включают фармацевтически приемлемый носитель.

[1108] под "фармацевтически приемлемым носителем" подразумевается, но не ограниченный к, нетоксический твердый, полутвердый или жидкостный наполнитель, разжижитель, инкапсулирующий материал или вспомогательный состав любого типа, например: липосомы.

[1109] фармацевтическая композиция настоящего изобретения для парентеральная инъекция может содержать фармацевтически приемлемую стерильные водные или неводные растворы, дисперсии, суспензии или эмульсии, как а также стерильные порошки для восстановления в стерильную инъекционную форму растворы или дисперсии непосредственно перед использованием. Примеры подходящего водного раствора и неводные несущие, разбавители, растворители или корабли включают воду, этанол, полиолы (такие как глицерин, пропиленгликоль, полиэтилен гликоль, и подобие), карбоксиметилцеллюлоза и соответствующие смеси из них растительные масла (например, оливковое масло) и инъекционные органические эстеры как этиловый олеат. Правильную текучесть можно поддерживать, ибо например, при использовании лакокрасочных материалов, таких как лецитин, путем поддержание необходимого размера частиц в случае дисперсий, а также с использованием поверхностно-активных веществ.

[1110] композиции настоящего изобретения также могут содержать адъюванты как, но не ограниченный к, предохранители, агенты обрызгивания, эмульгирующие агенты и диспергирующие агенты. Предотвращение действий таких лиц, как микроорганизмы могут быть обеспечены включением различных антибактериальных препаратов а также противогрибковые средства, например, парабен, хлорбутанол, фенол, сорбиновая кислота и тому подобное. Также может быть желательно включить изотонический агенты как сахара, хлорид натрия, и подобие. Длительный абсорбция injectable фармацевтической формы может быть принесена около мимо включение агентов которые задерживают абсорбцию как алюминий моностеарат и желатин.

[1111] в некоторых случаях, чтобы продлить действие препаратов, желательно: для замедления всасывания при подкожном или внутримышечном введении. Этот может быть выполнено с помощью жидкой суспензии кристаллического или аморфный материал с плохой растворимостью в воде. Скорость поглощения этих веществ: лекарство после этого зависит от своей скорости растворения которая, в свою очередь, может зависите от размера кристалла и кристаллической формы. Как вариант, задерживается абсорбция парентерально вводимой лекарственной формы осуществляется путем:

растворяющ или приостанавливающ лекарство в корабле масла.

[1112] инъекционные депо-формы изготавливаются путем формирования матриц микрокапсул препарата в биоразлагаемых полимерах, таких как полилактид-полигликолид. В зависимости от соотношения лекарственного средства к полимеру и характера определенный используемый полимер, тариф отпуска лекарства можно контролировать. Примеры других биоразлагаемых полимеров включают Поли (ортоэфиры) и Поли (ангидриды). Образования депо вводимые также подготовлены мимо улавливать лекарство в липосомах или микроэмульсиях которые совместимы с тканями организма.

[1113] инъекционные составы могут быть стерилизованы, например, путем фильтрация через бактери-сохраняя фильтр, или путем включать стерилизующие агенты в виде стерильных твердых композиций, которые могут быть растворенный или рассеянный в стерильной воде или другом стерильном вводимом средство непосредственно перед использованием.

[1114] твердые лекарственные формы для перорального введения включают, но не являются ограничена, капсулы, таблетки, таблетки, порошки и гранулы. В таком виде твердые лекарственные формы, активные соединения смешиваются по меньшей мере с одним изделием фармацевтически приемлемый наполнитель или носитель, такие как цитрат натрия или дикальцийфосфат и / или а) наполнители или расширители, такие как крахмалы, лактоза, сахароза, глюкоза, маннит и кремниевая кислота, б) связующие вещества такие как, например, карбоксиметилцеллюлоза, альгинаты, желатин, поливинилпирролидон, сахароза и акация, с) увлажнители, такие как глицерин, D) разрыхлители, такие как агар-агар, карбонат кальция, крахмал картошки или тапиоки, альгиновая кислота, некоторые силикаты и натрий карбонат, е) раствор замедляющих агентов, таких как парафин, F) поглощение ускорители, такие как четвертичные аммониевые соединения, г) смачивающие агенты такие как, например, ацетиловый спирт и моностеарат глицерина, ч) абсорбенты, такие как каолин и бентонитовая глина, и I) смазочные материалы, такие как тальк, стеарат кальция, стеарат магния, твердые полиэтиленгликоли, лаурилсульфат натрия и его смеси. В случае с капсулами, таблетки и таблетки, лекарственная форма также могут содержать буферные агенты.

[1115] твердые композиции аналогичного типа также могут быть использованы в качестве наполнители в мягких и твердых наполненных желатиновых капсулах с использованием таких вспомогательных веществ, как лактоза или молочный сахар, а также высокомолекулярный полиэтилен гликоли и тому подобное.

[1116] твердые лекарственные формы таблеток, драже, капсул, таблеток, а также гранулы могут быть приготовлены с покрытиями и оболочками, такими как кишечные покрытия и другие покрытия, хорошо известные в фармацевтической формулировке Рисунки. Они могут выборочно содержать глушители и могут также быть а состав, который они выпускают только активный ингредиент(ы), или предельно в определенной части кишечного тракта, необязательно, в запоздалая манера. Примеры встраиваемых композиций, которые могут быть использованы включают полимерные вещества и воски.

[1117] активные соединения также могут быть в микрокапсулированной форме, если целесообразно, с одним или несколькими из вышеупомянутых вспомогательных веществ.

[1118] жидкие лекарственные формы для перорального введения включают, но не являются ограничена, фармацевтически приемлемыми эмульсиями, растворами, суспензии, сиропы и эликсиры. В дополнение к активным соединениям, то жидкие лекарственные формы могут содержать инертные разбавители, обычно используемые в технике как, например, вода или другие растворители, солюбилизующие агенты и эмульгаторы как этиловый спирт, изопропиловый спирт, этиловый карбонат, этилацетат, бензиловый спирт, Бензилбензоат, пропиленгликоль, 1,3-бутиленгликоль, диметилформамид, масла (в частности, хлопковое семя, арахисовое, кукурузное, зародышевое, оливковое, касторовое и кунжутное масла), глицерин, тетрагидрофуриловый спирт, полиэтиленгликоли и сложные эфиры жирных кислот сорбитан и его смеси.

[1119] кроме инертных разбавителей, пероральные композиции могут также включать адьюванты, такие как смачивающие агенты, эмульгирующие и суспендирующие агенты, подслащивающие, ароматизирующие и ароматизирующие вещества.

[1120] суспензии, помимо активных соединений, могут содержать суспендирующие вещества в виде, например, этоксилированных изостеариловых спиртов, полиоксиэтиленсорбитол и сорбитан эфиры, микрокристаллическая целлюлоза, метагидроксид алюминия, бентонит, агар-агар и трагакант, а также смеси из них.

[1121] альтернативно, состав можно надуть и содержать а сжатый газ, такой как азот или сжиженный газовый топливо. То сжиженная топливная среда и действительно общий состав является предпочтительно такой, чтобы активные ингредиенты в нем не растворялись до в любом существенном объеме. Герметизированный состав может также содержать а ПАВ. Поверхностно-активное вещество может быть жидким или твердым неонный поверхностно-активный агент или может быть твердым анионным поверхностно-активным веществом агент. Предпочтительно использовать твердый анионный поверхностно-активный агент внутри в виде натриевой соли.

[1122] композиции настоящего изобретения также могут быть введены в виде липосом. Как известно в искусстве, липосомы, как правило, являются производный от фосфолипидов или других липидных веществ. Липосомы являются образовано моно-или многослойными гидратированными жидкими кристаллами, которые являются диспергируют в водной среде. Любые нетоксичные, физиологически приемлемые и метаболизируемый липид, способный формировать липосомы, может быть использован. То присутствующие композиции в липосомной форме могут содержать, помимо соединения изобретения, стабилизаторы, консерванты, вспомогательные вещества и подобный. Предпочтительными липидами являются фосфолипиды и фосфатидил холины (лецитины), как натуральные, так и синтетические. Способы формирования липосомы известны в области техники (см., например, Прескотт, Изд., Метафетамин. Клеточный Биол. 14: 33 et seq (1976)).

[1123] один из обычных навыков оценит, что эффективное количество агенты изобретения могут быть определены эмпирически и могут быть применяется в чистом виде или, если такие формы существуют, в фармацевтическом отношении приемлемая форма соли, сложного эфира или пролекарства. Агенты можно управлять к субъект, нуждающийся в лечении вирусной инфекции, как фармацевтический композиции в комбинации с одной или несколькими фармацевтически приемлемыми наполнители. Это будет понятно, когда вводится человеку пациент, полное ежедневное использование агентов или состав настоящее изобретение будет решаться лечащим врачом в рамках объем здравого медицинского суждения. Специфический терапевтической эффективный уровень дозы для любого конкретного пациента будет зависеть от различных факторы: тип и степень клеточной или физиологической реакции на воздействие достигните; деятельность специфических используемых агента или состава; используемые специфические агенты или состав; возраст, масса тела, общий здоровье, пол и диета пациента; время введения, маршрут следования администрация, и тариф экскреции агента; продолжительность лечение; препараты, используемые в комбинации или совпадающие со специфическими агент; и как факторы, хорошо известные в медицинском искусстве. Например, это хорошо в пределах навыка искусства начать дозы агентов на уровни ниже, чем те, которые требуются для достижения желаемого терапевтического эффекта влияние и постепенно увеличить дозировки до тех пор пока желаемый эффект не будет достигнутый.

[1124] дозировать можно также аранжировать в терпеливейшем специфическом образе к обеспечивают заданную концентрацию агентов в крови, так как определяется приемами, принятыми и рутинными в искусстве. Таким образом пациент дозируя сможете быть отрегулировано для того чтобы достигнуть регулярных продолжающийся уровней в крови, как измеряется ВЭЖХ, на порядок от 50 до 1000 нг/мл.

[1125] это будет легко очевидно для одного из обычных навыков в области соответствующие искусства которые другие соответствующие изменения и приспособления к методы и приложения, описанные здесь, могут быть сделаны без ухода из сферы применения изобретения или любого его варианта.

[1126] модифицированную сирну получают путем специального химического синтеза путем Дхармакон, в Lafayette Colo. Каждый C и U в пределах дуплекса siRNA (GL2), был заменен на 2' - F-U и 2' - F-C за исключением 3' - конца свис, который был dTdT.

[1127] для проверки стабильности 2' химически модифицированной сирны по сравнению с немодифицированной Сирна (siRNA), проводится следующий эксперимент. 4 ngs of Сирна добавляется в 20.МЮ. л Объем 80% сыворотки человека от здорового донор. Эту смесь инкубируют при температуре

37. степень. С. На различные времена от 1 минуты до 10 дней. Тот же процесс выполняется для 2' модифицированной фтором Сирна (2' - F siRNA). Когда инкубационный процесс идет готовые смеси помещают на лед, а затем сразу же разделяют постранично вместе с А.отхлебывать.32Р-контроль сирны. 2' модифицированная Сирна является стабильна по сравнению с немодифицированной сирной.

V. идентификация терапевтически активных агентов для лечения ОРВИ вирусная инфекция

[1128] изобретение обеспечивает способы лечения тора путем введения терапевтически активные агенты, такие как соединения малых молекул, к а млекопитающее, а также способы идентификации терапевтически активных агентов, как мощные малые молекулы, для обработки вируса SARS инфекция.

[1129] в одном из аспектов изобретения способ идентификации а предоставляется терапевтически активное средство, включающее: (а) контакт с терапевтически активное вещество с клеткой, инфицированной вирусом ОРВИ; б) измерение ослабления связанного с тора фермента.

[1130] в более частном варианте осуществления, терапевтически активное вещество это очень маленькая молекула. В другом более конкретном варианте осуществления, the терапевтически активным веществом является аналог нуклеозида (например, Рибавирин). В еще одним более конкретным вариантом реализации малой молекулы является SMIP или Пептидное иммуномодулирующее соединение. В другом, более конкретном варианте осуществления терапевтически активный агент пептид, олигопептид, или полипептид. В другом варианте осуществления связанной с SARS энзим является SARS протеаза. В другом варианте осуществления связанной с SARS энзим является SARS полимеразный. В еще одном варианте осуществления связанной с SARS энзим является а киназа. В еще одном варианте осуществления, связанной с SARS фермент является а протеаза. Ингибитор Фурина пептидилхлорметилкетон предотвращает образование блоков слияние клеток-клеток после mhv инфекции (de Naan et al. (2004) J Вироль), что предлагает наведение для терапии SARS.

[1131] изобретение включает в себя клеточный анализ, который может быть использован для экран для определения и определения терапевтически активного агента для лечения а вирусной инфекции ОРВИ. Терапевтически активные вещества по изобретению включить агенты, которые ингибируют, предотвращают или уменьшают репликацию атипичной пневмонии вирус. Такие агенты могут быть идентифицированы путем заражения культивируемой клетки (например как, например, клетки VERO) с вирусом SARS и оценка воздействия а потенциальных противовирусных соединениях при репликации вируса ОРВИ. Анализ к измерение влияния потенциального противовирусного соединения на репликацию вируса известны в искусстве и могут быть основаны на различных параметрах.

[1132] анализ на основе клеток может быть использован в высокопроизводительном экране, чтобы определение терапевтически активных соединений из химических библиотек содержит потенциальные противовирусные соединения. Терапевтически активный соединения, пригодные для использования в изобретении, могут ингибировать любые вирусные ОРВИ цель, которая необходима для репликации вируса в целых клетках. Эффективность (способность соединения ингибировать или инактивировать цель, будь то вирусные или клеточные, что приводит к снижению содержания вируса в культуре) терапевтического агента измеряется путем оценки жизнеспособности и/или пролиферация выживших клеток в инфицированной вирусом ОРВИ клетке Культура.

[1133] для измерения жизнеспособности клеток можно использовать ряд методов: известный в искусстве, таких как анализы измерения клеточных ферментов, белков, нуклеотидные ТРИФОСФАТЫ (например, АТФ), нуклеиновые кислоты (например, мРНК клетки-хозяина (например, gapdh) или последовательности рРНК) или клеточные метаболиты, такие как МТТ или МТС. Кроме того, флуоресцентные (в том числе, например, бумага HSV) или не-дневные краски (например диодид пропидия) или обозначать ДНК могут быть используется для измерения признаков жизнеспособности и/или пролиферации клеток.

[1134] альтернативно, эффективность смеси или образца можно определить путем сразу измерять количество вируса или вирусных продуктов в Культура. Способы измерения количества вируса, вирусного генома или вируса продукты включают: PCR, RT-PCR, TMA, протеины репортера а fluorescent или люминесцентные свойства или ферментативные функции (например, люцифераза, щелочная фосфатаза, GFP) или белки, которые могут быть обнаружены антителами (например, EGF), которые могут быть включены в вирусный геном до заражение культуры клеток. Кроме того, вирусные продукты, такие как viral белки могут быть измерены с помощью ИФА или ферментативной активности. Методы для идентификация вирусных полинуклеотидов, вирусных белков и специфических антител к вирусным белкам мы обратились выше.

[1135] потенциальные противовирусные соединения применяются для анализа на клеточной основе при концентрации примерно 10. м. м и классах соединений, имеющих терапевтический эффект определяется путем измерения параметра выбора (например, жизнеспособность/пролиферация клеток или вирус или вирусный геном или а вирусный продукт будь то вирусный по происхождению или не вирусный по происхождению). Однажды соединения идентифицируются как обладающие активностью, они ресинтезируются, и аналогично. Начиная с идентифицированного соединения, многие аналоги и новые соединения синтезируются в ходе последовательных оптимизационных циклов из методы синтеза, биологического профилирования и моделирования для оптимизации к структуре руководства до тех пор пока внутри-деятельность при vi во не будет разъяснена и оптимизирована.

[1136] клетки, пригодные для использования в анализе, включают в себя описанные клетки выше как соответствующий для продукции вакцины. Желательно, чтобы клетки были Африканские зеленые клетки почки обезьяны (Vero) клетки. Эмбриональное легкое человека фиброциты или нормальные человеческие диплоидные фиброциты могут также быть использованы в изобретение.

[1137] в одном варианте осуществления изобретение включает флуоресцентную основу анализ цитопатогенности для измерения потенциального противовирусного эффекта смесь на клетк-основанном assay. Один пример флуоресценции на основе анализ цитопатогенности показан ниже.

[1138] 1.раз.10.отхлебывать.4 ячейки Vero на лунку пластины микротиттера (МТР) заражаются определенным количеством вируса ОРВИ, выбранного в пределах следующие диапазоны для оптимального MOI: 5-10, 10-25, 25-50, 50-100, 100-500, или ... 500-1000 PFU в общем объеме 200. му. l носитель (m199 носитель дополнено с 5% FCS, 2 mM глутамин, пенициллином 100 IU / ml и 100 .му. г / мл стрептомицина) при наличии или отсутствии потенциала противовирусное соединение и инкубируемое по меньшей мере в течение одного года 1, 2, 3, 4, 5, 6, или 7 дней в 37 лет.степень. С., 5% СО.SUB.2. Скважины МТТ промываются с помощью PBS (200. му. l) и после этого заполненный с 200 .му.l PBS содержа 10.му. g / ml диацетат флуоресцеина. После 45-минутной инкубации при комнатной температуре, флуоресценция измеряется при возбуждении 485 Нм и излучении 538 Нм диапазон волн. ИС.SUB.50 значений определяются нелинейным сюжетом из противовирусная активность как функция концентрации препарата.

[1139] другие клеточные анализы известны в данной области техники и включают в себя, в частности: другие, методы обнаружения GFP и обнаружения Лус. Кроме того, а Комплект Протега доступен на рынке, что обеспечивает дополнительные методы измерения жизнеспособности клеток и др.

[1140] в одном варианте осуществления изобретение включает способ измерения эффективность потенциального противовирусного соединения с использованием РТ-ПЦР для выявления уровня вирусной РНК SARS в клеточном анализе на основе. Способы применения РТ-ПЦР известны в своем искусстве. Один из примеров такого анализа описан ниже.

[1141] 5.раз.10.отхлебывать.6 клеток Vero высевают в культуру тканей. Колбы содержащие клетки инкубируют в течение ночи при 37.степень. С., 5% СО.SUB.2. Клетки заражены (m.o.i.=1) с вирусом SARS в наличие и отсутствие потенциальных противовирусных соединений. По желанию, то клетки могут быть предварительно обработаны потенциальным соединением до заражения. В любом случае, соответствующий assay клетки управления также подготовлен.

[1142] РНК инфицированных клеток очищается через 2 ч (UL54), 12 ч (UL8) и 16 h (UL13) после инфекции, очищение РНК (Qiagen) (набора RNeasy; 40.MU. l элюция) и количественно (поглощение при 260 Нм). РНК (2 .му. g) обратно транскрибируется с помощью специфического праймера (2 пмоль, используя один из пар праймеров, описанных здесь) в кднк в соответствии с Протокол Superscript II (Invitrogen). Аликвоты (2 .му.l) реверса реакция транскрипции усиливается методом ПЦР. Фрагменты соответствующие целевой ген SARS, т. е. ген, кодирующий фермент SARS, амплифицируются в 30

циклов (УЛ54 и УЛ8: 3 мин, 94.степень. С. Горячий старт; 1 минута, 94.степень. С. денатурация; 1 мин, 55.степень. С. отжиг; 1 минута, 72.степень. С. полимеризация. УЛ13: 3 мин, 94.степень. С. Горячий старт; 1 мин, 94.степень. С. денатурация; 1 мин, 60.степень. С. отжиг; 1 минута, 72.степень. С. полимеризация) методом ПЦР (Тақ-полимераза, Стратаген), в а 100 - . МЮ. л реакционный объем с соответствующими олигонуклеотидами, как описано здесь на 0,1 нмоль каждого. 8 - . му. 1 аликвоты цикла 20-30 (майны 2-12) ПЦР были разрешены на 2% агарозном геле (Invitrogen) согласно к инструкции изготовителя.

[1143] клеточные анализы по изобретению могут необязательно использовать вариант или производное вируса ОРВИ дикого типа, которое уменьшилось или ослабилось вирулентность в моделях человека и/или животных (например, мышь, нечеловеческий примат, и т.д.) Использование таких ослабленных вирусов ОРВИ в методах скрининга может уменьшить проблемы безопасности и меры предосторожности, которые в противном случае были бы связаны с патогенная природа вируса торс и может исключить или уменьшить потребность в реализации громоздких высоких уровней сдерживания во время проведение анализов и скрининга соединений.

[1144] изобретение включает в себя ферментативный анализ, который может быть использован для экран для определения и определения терапевтически активного агента для лечения о вирусной инфекции ОРВИ.

[1145] вариантом осуществления изобретения является пробирика, содержащая контактирование а известное количество протеазы SARS в растворе к пептиду содержа а обнаруживаемый маркер и участок расщепления для протеазы SARS, где SARS активность протеазы контролируется путем измерения интенсивности маркера на Расколотый продукт.

[1146] в более частном варианте осуществления, способ определения атипичной пневмонии обеспечена протеаза, содержащая контактирование образца раствора, содержащего Атипичная протеаза с пептидом, содержащим флуоресцентный донор, флуоресцентная Гаситель и участок расщепления для протеазы SARS, указанный пептид является обнаруживается с помощью флуорометра при расщеплении, где атипичная протеаза активность определяется в образце по количеству флуоресценции обнаружен флуорометром.

[1147] анализы, основанные на прямом измерении ингибирования протеазы SARS может быть использован для скрининга на терапию ОРВИ. Протеаза для таких анализы, такие как ЗС-подобная протеаза и папаиноподобная протеаза, могут быть выделены и очищенный для таких анализов как описано в Seybert, et al., J. Gen. Вироль., 78:71-75, 1997, Ziebuhr, et al., ADV. Exp. Медицинский. БИОЛЬ., 440:115-120, 1998, Sims, et al., ADV. Exp. Медицинский. БИОЛЬ. 440:129-134, 1998, Ziebuhr, et al., J. Virol., 73: 177-185, 1999, Teng, et al., J. Virol., 73: 2658-2666, 1999, Herold, et al., J. Biol. Хим.. 274:14918-14925, 1999, и Зибур, и др., J. Biol. Хим.. 276:33220-33232, 2001. Кроме того, В Примере 30 описан новый метод очистки протеазы SARS с использованием колоночная хроматография. Пример 31 описывает непрерывную флуоресценцию резонансный анализ переноса энергии (лад) для измерения протеазы SARS Активность. Анализы основанные энзимом протеазы как анализ Лады продемонстрированные в примере 31 легко адаптируются для высокой пропускной способности скрининг и используются для скрининга кандидатных противовирусных соединений. Проведение ферментативного анализа протеазы в присутствии атипичной пневмонии соединение ингибитора протеазы будет показывать уменьшенное количество флуоресценции в данный момент времени по сравнению с отрицательным контрольным анализом, содержащим по испытайте смесь на non-блокируя смеси управлением. Такой способ был бы включают в себя следующие этапы: а) предоставление аналитического решения, содержащего торс протеазы; (b) добавление испытательного соединения к раствору для анализа; (с) добавление а субстрат для протеазы SARS к раствору анализа; и (d) измерять протеолитическая активность в пробирном растворе. В предпочтительном варианте осуществления, протеолитическая активность измеряется по флуоресценции флуорофора продукт, полученный ферментативной активностью протеазы SARS.

[1148] Атенуированные варианты вируса атипичной пневмонии обычно содержат один или несколько модификации генома или мутации (например, замены, делеции, вставки) в кодирующих или не кодирующих областях белка. Конкретный пример к аттенуирующим мутациям относятся, например, генетические модификации в 5' - конечная не кодирующая область, последовательность лидеров, межпоколенческие области, 3'-конечная область не кодирующая область, ORF 1a, ORF 1b, s ген, e ген, М ген, N ген или любой генов неструктурного белка вне области ORF 1a / 1b. Предпочтительными аттенуирующими мутациями являются структурные белки вируса ОРВИ (например, Спайк (Ы)), протеазный или полимеразный домен, или не кодирующей последовательность (например, 5' - конечная не кодирующая область, межгеновая последовательность). В кроме того, место расщепления может быть введено или устранено в пределах спайковый белок (см., например, Gombold et al., J. Virol. 67:4504-4512, 1993; Bos et al., Вирусология 214: 453-463, 1995), такое изменение которое может также пригодится для оптимизации экспрессии рекомбинантного Спайка белковый антиген (например, для целей вакцинации).

[1149] в соответствии с настоящим изобретением используются различные способы для получения аттенуированных вариантов вируса ОРВИ. Такой метод включить последовательное прохождение вируса атипичной пневмонии в культивируемых клетках (например, культура клеток млекопитающих, таких как клетки почек плода резуса или клетки VERO), пока вирус атипичной пневмонии не продемонстрирует ослабленную функцию. Серил распространение вируса может осуществляться при любой температуре, при которой ткань затухание прохода культуры происходит, и может быть выполнено совместно с одним или несколькими этапами мутагенеза (например, химический мутагенез). То аттенуированный фенотип вариантов вируса ОРВИ, полученных после одного или нескольких клеточные культуры проходов, легко измеряется одним специалистом в этой области. Как использованный здесь, амортизация ссылается к уменьшенной вирулентности SARS вирус в человеческом субъекте. Доказательство ослабленной функции может быть показано уменьшенными уровнями вирусной репликации или уменьшенным вирулентность в животной модели.

[1150] другие способы получения аттенуированного вируса SARS включают клетку культурное прохождение вируса при неоптимальных температурах (холодовое прохождение), а также введение аттенуирующих мутаций в вирус ОРВИ геном методом случайного мутагенеза (например, химический мутагенез, такой как использование 5-фторурацил) или с использованием направленного мутагенеза. Подготовка и генерация аттенуированных вакцин против РСВ (методы применения которых будут в основном применимо к вирусу торс) раскрыты в, например, EP 0640128, США. Похлопать. No. 6,284,254, U. S. Pat. No. 5,922,326, U. S. Pat. № 5.882651.

[1151] число проходов, необходимых для получения безопасных, иммунизирующих препаратов. аттенуированный вирус зависит по крайней мере частично от условий заняты. Периодическое тестирование культуры вируса атипичной пневмонии на вирулентность и иммунизирующая способность у животных (например, мыши, примата) может легко проявляться определите параметры для конкретной комбинации культур тканей и температура.

[1152] в другом варианте осуществления, клетк-основанный ассай для экранировать противовирусные соединения основаны на считывании экспрессии гена продукт (например, репортерный ген продукта), который не является от вируса ОРВИ. Ген продукты в частности соответствующие к настоящему вымыслу включают, но не ограничиваясь только теми из описанных выше анализов.

[1153] чтобы достичь такого считывания, ген-интереса (GOI) кодирующий указанный ген репортерный генный продукт должен быть включен в а репликация генома вируса атипичной пневмонии или конструкция, полученная из вируса атипичной пневмонии геном (например, вирус атипичной пневмонии герпсон, вирус атипичной пневмонии defective-interfering (DI) РНК). ИНЖИР. 13-это схема, изображающая места для инкорпорации репортерный ген в геном вируса ОРВИ. Предпочтительно, вставка а гетерологичный репортерный ген, представляющий интерес, находится на участке между существующими SARS вирусные гены, такие как например, как показано на фиг. 13. Например, в GOI может быть введен близко после кодона прекращения SARS ген вируса (например, ORF 1b, S, E, M, N). Вставка должна быть расположена внутри чтобы свести к минимуму нарушение транскрипции мРНК для вируса SARS ген (ы). GOI может также быть введен как в-рамка "сплавление" с ап существующий ген вируса атипичной пневмонии, такой, что достаточная функция ГОИ является поддерживается для обнаружения. Для оптимизации выражения, дополнительный SARS межгеновая последовательность вируса (например, SEQ ID NO: 7388, С или без дополнительные фланкирующая последовательности вируса SARS) могут также быть проектированы в а позиция, предшествующая вставленному GOI.

[1154] инкорпорация GOI в вирус SARS может быть выполнена одним от мастерства в этом искусстве используют самые разные приемы. Например, один предпочтительным методом является направленная рекомбинация РНК, которая использует преимущества способность РНК коронавируса проходить рекомбинацию внутри клетки (см., например, Fischer et al., J. Virol. 71: 5148-5160, 1997; Koljesag и др.- J. Vet. Sci. 2:149-157, 2001). Конструкция желаемого конфигурация (например, кднк дефектной интерферирующей РНК вируса SARS) содержащая ГОИ с фланкированной последовательностью

вируса атипичной пневмонии (например, интергенной последовательность) генерируется таким образом, что РНК может быть транскрибирована непосредственно в пределах эукариотической клетки или *in vitro* и также трансфицированная в восприимчивые клетки заражен вирусом ОРВИ. Рекомбинантный вирус, содержащий ГОИ является идентифицируется на основе выражения маркера, кодируемого ГОИ.

[1155] альтернативно, включение ГОИ в вирус SARS может быть выполненным одним из мастерства в искусстве, сначала собирая полнометражный кднк-клон вируса ОРВИ, который может быть использован для получения инфекционной РНК транскрипты *in vivo* (например, от промотора РНК-полимеразы II) или *in vitro* (например, от промотора бактериофага). Хотя и относительно давно в длина генома, такое собрание полнометражного клона кднк теперь охотно достижимый одним из навыков в искусстве с использованием стандартной молекулярной биологии и обратные методы генетики и последовательность генома вируса SARS (см., например, Thiel et al., *J. Gen. Virol.*, 82:1273-1281, 2001; Almazan et al., *Процесс. Натл. Акад. Sci. США* 97:5516-5521, 2000; Thiel et al. (2003) *J Gen Virol* 82:1273-1281; Yount et al (2003) *PNAS USA* 100:12995-13000). Вставка гетерологичного Гоа в полнометражный торс кднк генома вируса может быть выполнена с использованием различных методов, таких как например, лигирование в природные или синтетические сайты рестрикции, ПЦР (например, наложение ПЦР) и рекомбинация.

[1156] также может быть желательно использовать аналогичный вирус SARS рекомбинанты, содержащие ген, представляющий интерес для антивирусного скрининга, однако с дальнейшей модификацией-для минимизации или устранения вирусных воздействий цитопатология (например, CPE). Нецитопатические производные от вируса ОРВИ могут быть получены одним из навыков в этом искусстве, используя различные методы. Для например, выбираемый маркер (например, маркер лекарственной устойчивости) может быть: инкорпорированный как ГОИ в геном вируса SARS для того чтобы произвести инфекционный вирус как описано выше (см., Например, Perri et al., *J. Virol.*, 74:9802-9807, 2000). Инфекционный Гои-содержащий вирус атипичной пневмонии или инфекционный затем геномная РНК / кднк используется для заражения / трансфекции клеток (например, VERO), причем или без предварительного мутагенеза, по истечении которого инфицированные клетки подвергаются соответствующему отбору. Только те клетки, которые содержат SARS вирус, укрывающий как выбираемый маркер, так и одну или несколько мутаций рендеринг вируса не-цитопатический выдержит процесс отбора и вырастает сами. Активная репликация вируса атипичной пневмонии в этих клетках осуществляется легко обнаружен с использованием различных методов обнаружения (например, ПЦР, Northern blot) и такие клетки могут служить субстратом для клеточного скрининга анализы. Мутации, которые приводят к желаемому нецитопатическому вирусу торс фенотип может включать в себя нуклеотидные замены, делеции или дополнения, и может происходить в различных кодирующих или некодирующих регионах генома (например, 5' или 3' - конечные некодирующие области, межполюсные области, ORF1a, ORF1b, а домен протеазы, домен полимеразы). Идентификация таких мутации легко выполняются путем обмена последовательностями с диким типом (например, Родительский) вирус ОРВИ и демонстрация переноса фенотипа, и секвенирование соответствующего региона генома. Подобные мутации, что уменьшите или исключите цитопатогенность также смогут быть использовано в контексте из вируса ОРВИ выведен вектор-репликон, либо путем аналогичного отбора сразу используя репликон SARS или специфическим инженерством репликон на основе мутации(ов), идентифицированной в контексте инфекционного заболевания Вирус торс, как описано выше. Кроме того, такие мутации могут служить в качестве основа для аттенуированных производных вируса SARS, как описано в другом месте в этом документе.

[1157] альтернативно, вместо использования заразного вируса атипичной пневмонии или своего производные для клеточных скрининговых анализов, дефектных по размножению "репликоны" могут быть спроектированы и использованы. Такие репликоны поддерживают все последовательности кодирования белка и последовательности репликации *cis*, необходимые для РНК репликация и выражение внутри ячейки, но удаляются из одной или нескольких ячеек последовательности или гены, необходимые для упаковки вируса ОРВИ потомства (см. Для пример Curtis et al., *J. Virol.*, 76:1422-1434, 2002). ИНЖИР. 14 - это а схема, изображающая репрезентативные примеры репликонов вируса SARS согласно настоящему изобретению. Например, кднк вируса SARS создается конструктор, в котором отсутствует один или несколько (или все) структурных элементов белок, кодирующий гены, в результате чего отсутствует ген (ы) вируса SARS is / are замененный на ГОИ, поддерживающий все необходимые сигналы транскрипции для выражение лица ГОИ. Функционально связан с кднк вируса атипичной пневмонии репликон конструктор является промотором для РНК-полимеразы, который может быть использован для транскрипции РНК-репликон *in vivo* (например, промотор РНК-полимеразы II) или *in vitro* (например, промотор бактериофага). Репликон SARS может быть введен в восприимчивая клетка путем трансфекции в виде РНК или ДНК, в зависимости от промотор выбора, и перенесенные клетки могут быть использованы для оценка противовирусных соединений. Путем включения одной или нескольких мутаций отрисовав репликон нецитопатический для клеток (см. выше), можно избегайте необходимости в трансфекции нуклеиновых кислот каждый раз, когда анализ должен быть выполненным.

[1158] альтернативно, репликоны вируса SARS могут быть упакованы в вирус как частицы которые позволяют инфекции клеток, вернее чем требующ трансфекция молекул нуклеиновых кислот. Требование для репликон упаковка заключается в том, что основные функции гена вируса ОРВИ удалены из репликон (например, один или несколько структурных белков) предоставляются в *trans* внутри ячейки, содержащей репликон. Разнообразие методов для упаковка РНК репликон может быть использована для одного из навыков в этой области (см. например, Curtis et al., *ibid*: Ortego, et al., *J. Virol.*, 76:11518-11529, 2002). Например, стабильно преобразованные линии ячеек конститутивно или индуцибельно экспрессирующий требуемый ген вируса торс функции могут быть использованы. В качестве альтернативы, необходимый ген вируса торс функции могут быть выражены вирусными векторами, которые вводятся в систему клетка, содержащая репликон. В качестве альтернативы дефектный мешающий (DI) SARS вирусная производная РНК, содержащая необходимые функции генов, может быть: вводится в клетку, содержащую репликон. Такие конструкции Ди используемые к дополните отсутствующие функции репликона можно чаще всего называть дефектная вспомогательная РНК или дефектные помощники.

[1159] еще одна конфигурация, полезная для клеточного антивирусного скрининга анализы согласно настоящему изобретению используют Ди, полученные из вируса ОРВИ РНК, кодирующие Гои (см., например, Стремена и др., *J. Gen. Virol.*, 81:1687-1698, 2000; Ляо и др., *Вирусология* 208: 319-327, 1995). Введение SARS DI, либо в виде кднк, связанной с РНК-полимеразой II промотор или как *in vitro* транскрибированная РНК, в восприимчивые клетки также зараженный вирусом SARS, позволяет считывать данные *goi reporter* продукт в анализах.

[1160] система на основе репликона для быстрой идентификации коронавируса ингибиторы репликазы описаны Hertzog et al. (2004) *J Gen Virol* DOI 10.1099/vir / 0 / 80044-0. Кратко, система использует non-цитопатическое дискретная РНК репликон которую можно стабилизированно поддерживать в *eukaryotic* ячейки. РНК репликон опосредует экспрессию репортерного гена в качестве маркера для репликация коронавируса, и выражение репортера можно использовать к испытать ингибиторное влияние смесей теста *in vitro*, таким образом позволяющ высокая пропускная способность скрининга для ингибиторов репликазы без необходимости вырастить инфекционный вирус. Предпочитаемые РНК репликон включают неомицин ген резистентности в гене репликазы с нижестоящим репортерным геном (например GFP) который выражен через репликаза-посреднический синтез а субгеномная мРНК.

VI. композиции и способы лечения вирусной инфекции SARS

[1161] настоящее изобретение относится к композициям и способам для осуществления способа. лечение и / или профилактика ОРВИ. Изобретение дополнительно включает в себя способ лечения и/или профилактики ОРВИ через дыхательные пути введение терапевтически эффективного количества, по крайней мере одного противовирусное соединение из числа описанных в патентах США и опубликованные международные патентные заявки, перечисленные в Таблице 1 и табл. 2. В одном варианте осуществления способа противовирусное соединение представляет собой небольшое молекула. В другом варианте осуществления противовирусное соединение представляет собой протеазу ингибитор. В более дальнейшем варианте осуществления, противовирусный и АБС битор протеазы а ЗС-подобный ингибитор протеазы и / или папаиноподобный ингибитор протеазы. Комбинированное лечение с использованием протеазы лопинавир/ритонавир (Калетра) ингибитор и рибавирин показали благоприятный клинический ответ (Chu et al. (2004) *Thorax* 59: 252-256). В другом варианте осуществления, противовирусный соединение является ингибитором РНК-зависимой РНК-полимеразы. В другом вариант осуществления, первым противовирусным соединением, являющимся ингибитором протеазы, является вводят со вторым противовирусным соединением, которое является РНК-зависимым Ингибитор РНК-полимеразы. Изобретение дополнительно предусматривает: применение стероидного противовоспалительного препарата в комбинации с по крайней мере одно противовирусное соединение, например, из состава противовирусного соединения, описанные в документах, перечисленных в Таблице 1 и Таблице 2. Один комбинированное лечение стероидов и рибавирин было описано с помощью Fujii et al. (2004) *J Заразить Химиотерапию* 10: 1-7. Комбинированное лечение кортикостероиды и интерферон alfacon-1 также были сообщены (Loutfy и др. (2003) *JAMA* 290: 3222-3228).

[1162] изобретение дополнительно предусматривает способ обработки и / или профилактика ОРВИ путем назначения терапевтического средства эффективное количество по крайней мере одного противовирусного соединения из их числа описанный в патентах США и опубликованный

международный патент применения перечисленные в Таблице 1 и Таблице 2 вдыханием. В другом аспект, противовирусная смесь может быть управляема в комбинации с a SMIP, SMIS или другие иммуномодулирующие соединения, такие как указанные в таблице 34 и в Табл. 35. В одном варианте осуществления способа противовирусное соединение это очень маленькая молекула. В другом варианте осуществления противовирусное соединение представляет собой ингибитор протеазы. В следующем варианте осуществления противовирусная протеаза ингибитор представляет собой ЗС-подобный ингибитор протеазы и / или папаиноподобную протеазу ингибитор. В другом варианте осуществления противовирусное соединение является ингибитором РНК-зависимой РНК-полимеразы. В другом варианте осуществления, первый противовирусное соединение, представляющее собой ингибитор протеазы, вводят вместе с второе противовирусное соединение, представляющее собой РНК-зависимую РНК-полимеразу ингибитор. Изобретение дополнительно предусматривает введение а стероидное противовоспалительное средство в комбинации по меньшей мере с одним противовирусное соединения, например, из описанных противовирусных соединений в документах, перечисленных в Табл.1 и табл. 2. Стероидаль противовоспалительное средство можно вводить ингаляционно для местного применения влияние или управляемый для внутрирастительной абсорбции как через устное или внутривенный маршрут.

[1163] изобретение дополнительно предусматривает способы лечения ОРВИ инфекция, включающая введение мелкомолекулярного иммунопотенциатора (SMIP) соединения либо самостоятельно, либо в комбинации с противовирусным соединением или в сочетании с вакциной от ОРВИ. В следующем варианте осуществления, SMIP представляет собой соединение, раскрытое в настоящем документе или изложенное в таблице 34.

[1164] изобретение дополнительно предусматривает способы лечения ОРВИ инфекция, включающая введение иммуносупрессорного соединения, выборочно небольшое соединение усмирителя молекулы (SMIS) или самостоятельно или в сочетании с противовирусным препаратом. В следующем варианте осуществления, the иммунодепрессантное соединение раскрыто здесь или изложено в таблице 35.

[1165] изобретение дополнительно обеспечивает пептидный иммуномодулятор композиции, включающие олиго и полипептиды, способные оказывать воздействие воспалительная реакция у пациента. В одном варианте осуществления, пептидный иммуномодулирующая композиция способна стимулировать клетки человека к продуцированию цитокины. В другом варианте осуществления пептидный иммуномодулятор композиция способна снижать уровень цитокинов в организме человека. Предпочтительными примерами пептидных иммуномодулирующих композиций являются: те, которые перечислены в таблице 35, а также TGF.бета.2, TGF.бета.1, TGF.бета.3, тимопентин (TP5), бета.-меркаптопропионил-аргинил-лизил-аспартил-валил-тирозил-цистеин Амид, колостринин, лактоферрин (LF), циклоинопептид а (CLA), и туфцин (ТКПР). Пептидные иммуномодулирующие композиции из изобретение может быть использовано отдельно или в сочетании с другими средствами, предпочтительно противовирусные соединения, для лечения ОРВИ.

[1166] изобретение дополнительно предусматривает комплект для использования потребителем в течение лечение и / или профилактика ОРВИ. Такой комплект включает в себя: а) а фармацевтическая композиция, содержащая терапевтически эффективное количество по меньшей мере одного противовирусного, SMIP, SMIS или другого иммуномодулирующего соединения из числа описанных в патентах США и опубликованных международных патентные заявки, перечисленные в Таблице 1, таблице 2, таблице 34 и таблице 35 и фармацевтически приемлемый носитель, транспортное средство или разбавитель; б) контейнер для удерживания фармацевтической композиции; и, необязательно, с) инструкции, описывающие способ применения фармацевтических композиций для лечения и / или профилактики ОРВИ. Комплект может быть опционально содержат множество соединений для лечения ОРВИ, в которых противовирусные соединения выбираются из ЗС-подобных ингибиторов протеаз и папаиноподобные ингибиторы протеазы. В дальнейшем варианте исполнения, комплект содержит противовирусное соединение, которое является РНК-зависимой РНК-полимеразой ингибитор. Если набор содержит более одного антивируса, SMIP, SMIS, или другие иммуномодулирующие соединения, соединения, содержащиеся в комплекте могут быть необязательно комбинированным в одной и той же фармацевтической композиции.

[1167] дополнительный аспект изобретения предусматривает использование Ат наименее - один из противовирусных, SMIP, SMIS или других иммуномодулирующих препаратов соединения, описанные в патентах США и опубликованных международных патентах применения перечисленные в Таблице 1, таблице 2, таблице 34 и таблице 35 для производство лекарственного средства для лечения или профилактики ОРВИ.

[1168] дополнительный аспект изобретения предусматривает использование Ат по меньшей мере одно соединение SMIP, или по меньшей мере одно иммуносупрессорное соединение, или по крайней мере одно соединение SMIS для изготовления лекарственного средства для лечение или профилактика ОРВИ. Предпочитаемый SMIP, иммуносупрессор, и Соединения SMIS описаны здесь.

[1169] если не указано иное, следующие термины, когда они используются в рамках Раздел VI: "композиции и способы лечения вируса SARS Инфекция " настоящего приложения имеют следующие значения::

[1170] как использовано здесь, "предел"," обработка "и" обработка " являются следующими взаимозаменяемые термины, такие как" ограничение "и" лечение " и, как используется сюда же относятся профилактические (например, профилактические) и паллиативные средства лечение или акт оказания профилактического или паллиативного лечения. Эти термины включают в себя отсрочку развития симптомов торс и/или а уменьшение выраженности таких симптомов, которые будут или ожидаются развиваются после заражения вирусом ОРВИ. Эти условия также включают: улучшение существующих симптомов торс, предотвращение дополнительных симптомов, улучшающ или предотвращающ основные метаболически причины симптомов.

[1171] репрезентативные применения композиций и методов настоящего исследования изобретение включает в себя: устранение или снижение вирусной нагрузки от Вирус атипичной пневмонии у позвоночных, в том числе у человека, элиминация или уменьшение симптомов, связанных с торс, и снижение заболеваемости ассоциируется с ОРВИ. В популяции пациентов с атипичной пневмонией, использование композиции и способы осуществления изобретения приведут к уменьшению количества высокие показатели смертности связаны с ОРВИ.

[1172] заражение вирусом ОРВИ и симптомы, связанные с ним Атипичная пневмония может быть обработана в субъекте путем введения композиций изобретение. Композиции по изобретению могут быть введены системно. Для системной пользы, смеси здесь сформулированы для парентеральные (например, внутривенные, подкожные, внутримышечные, внутривнутриношное, интраназальное или трансдермальное) или энтеральное (например, устное или ректальная) доставка по общепринятым методикам. Внутривенный введение может осуществляться серией инъекций или путем непрерывной инфузии в течение длительного периода времени. Администрация впрыской или другими путями дискретно расположенное введение может выполняться с интервалами в диапазоне от еженедельного до одного-трех раз в день и более. В качестве альтернативы, the композиции, раскрытые в настоящем документе, могут вводиться циклически (администрирование раскрытого состава, за которым не следует администрирование, далее следует администрирование раскрытых композиций и тому подобное). Лечение будет продолжаться до тех пор, пока не будет достигнут желаемый результат.

[1173] "субъект" - это позвоночное животное, включающее человека, который находится внутри необходимость обработки композициями, способами и наборами настоящего времени изобретение. Термин "субъект "или" субъекты " предназначен для обозначения как того, так и другого мужской и женский пол, если только один из них конкретно не указан.

[1174] "совместное управление" комбинацией нескольких противовирусных препаратов соединения означают, что эти компоненты могут быть введены вместе в качестве композиция или в составе той же, унитарной лекарственной формы. "Совместное применение" также включает введение нескольких противовирусных препаратов соединения отдельно, но в рамках одного и того же терапевтического лечения программа или режим. "Совместное администрирование" также включает в себя администрирование а множество других агентов, таких как, например, олигопептид, а полипептид, пептидный иммуномодулятор, нуклеиновая кислота, антитела или а вакцина, в которой соединения или агенты вводятся отдельно, но в рамках одной и той же лечебной программы или схемы лечения. То компоненты обязательно должны быть введены в основном же время, хотя они могут, если пожелают. "Совместное администрирование" также включает в себя отдельное администрирование в разное время и в любом порядке. Например, в соответствующих случаях пациент может принимать один или несколько компонентов(ов) препарата. обработка в утре и одно или больше из других компонентов на ночь.

[1175] под "противовирусным соединением", используемым здесь, подразумевается противовирусное средство. соединение, как описано в патентах США и опубликованных международных патентные заявки приведены в Табл. 1 и табл.2. Патенты США и опубликованные международные патентные заявки,

перечисленные в Таблице 1, Таблица 2 и таблица 35 включена здесь полностью. Одновременно вариант осуществления противовирусное соединение представляет собой РНК-зависимую РНК-полимеразу. В еще одним предпочтительным вариантом реализации противовирусного соединения является ЗС-подобная протеаза ингибитор или папаиноподобный ингибитор протеазы. Противовирусные соединения может вводиться в виде кислоты или растворимого щелочного металла соль или соль щелочноземельного металла, где это уместно.

[1176] точная дозировка противовирусной смеси поменяет с график дозирования, пероральная потенция конкретного противовирусного соединения выбирается, возраст, размер, пол и состояние испытуемого, степень тяжести заболевания расстройство, подлежащее лечению, и другие соответствующие медицинские и физические факторы. Таким образом, точное фармацевтически эффективное количество не может быть указанные заранее и могут быть легко определены опекуном или попечителем. клиницист.

[1177] как правило, выбирается соответствующее количество противовирусного соединения для получения снижения нагрузки вируса ОРВИ в субъекте и/или для получения снижения симптомов, связанных с ОРВИ. Для людей, эффективная пероральная доза противовирусного соединения обычно составляет около 1,5 до приблизительно 6000. мг. g/kg веса тела в день и предпочтительно около 10 к около 2000. мг. g / kg веса тела в день.

[1178] один из обычных навыков в этом искусстве признает, что некоторые противовирусные, SMIP, SMIS и иммуномодулирующие соединения по изобретению в том числе ЗС-подобные ингибиторы протеазы, папаиноподобные ингибиторы протеазы, а РНК-зависимые ингибиторы РНК-полимеразы будут содержать один или более атомы, которые могут находиться в определенном стереохимическом, таутомерном или геометрической конфигурация, давая подъем к стереоизомерам, таутомеры и конфигурационные изомеры. Все такие изомеры и их смеси являются входит в данное изобретение, когда активен. Кристаллическая и аморфная формы из противовирусных соединений данного изобретения также включены как есть гидраты, сольваты, полиморфы и изоморфы противовирусных соединений об изобретении.

[1179] SMIP соединения изобретения включают соединения, описанные в выдан американский патент. № 4 547 511 и 4 738 971 с общей структурой (а): # # STR2## для обработки разладов отзывчивых к агентам это повышает клеточный иммунитет.

[1180] иммуностимулирующими олигонуклеотидами и полинуклеотидами являются: описано в PCT WO 98/55495 и PCT WO 98/16247. Патентная заявка США No. 2002/0164341 описывает адьюванты, включая неэтилированную CpG динуклеотид (CpG ODN) и адьювант нуклеиновой кислоты. патент США В заявке № 2002/0197269 описываются композиции, включающие в себя: антиген, антигенный CpG-ODN и поликатионный полимер.

[1181] кроме того, выпущен американский патент. № 4 689 338, 5 389 640, 5,268,376, 4,929,624, 5,266,575, 5,352,784, 5,494,916, 5,482,936, 5,346,905, 5,395,937, 5,238,944, 5,525,612, WO99/29693 и США Ser. Нет. 09/361, 544 раскрывают соединения общей структуры (b): # # STR3## для использования в качестве " модификаторов иммунного ответа."

[1182] описаны дальнейшие соединения с SMIP и противовирусной активностью ниже и в патентной заявке США под названием Тиосемикарбазоны в качестве Анти-вирусные препараты и Иммунопотенциаторы поданы в декабре. 29, 2003 г. с Ан адвокатская книжка номер PP19814. 004US обычно раскрывающий соединения следующий состав:

[1183] соединение формулы с: # # STR4##

[1184] где: E отсутствует или выбран из группы, состоящей из алкил, замещенный алкил, циклоалкил, замещенный циклоалкил, Арил, замещенный Арил, гетероцикл, замещенный гетероцикл, гетероарил и замещенный гетероарил;

[1185] L отсутствует или выбран из группы, состоящей из охо, amino, алкилен, замещенный алкилен, алкокси, алкиламино, aminoалкил, гетероцикл, карбоцикл и карбонил;

[1186] W отсутствует или выбран из группы, состоящей из циклоалкила, замещенный циклоалкил, Арил, замещенный Арил, гетероцикл, замещенный гетероцикл, гетероарил и замещенный гетероарил;

[1187] X отсутствует или выбран из группы, состоящей из охо, amino, алкилен, замещенный алкилен, алкокси, алкиламино, aminoалкил, гетероцикл, карбоцикл и карбонил;

[1188] Y выбирается из группы, состоящей из циклоалкила, замещенного циклоалкил, Арил, замещенный Арил, гетероцикл, замещенный гетероцикл, гетероарил и замещенный гетероарил;

[1189] Y ' отсутствует или выбран из группы, состоящей из F, Cl, Br, I, нитро, алкил, замещенный алкил и необязательно замещенный гетероцикл, amino, алкиламино, диалкиламино;

Y " отсутствует или выбирается из группы, состоящей из F, Cl, Br, I, нитро, алкил, замещенный алкил и необязательно замещенный гетероцикл, amino, алкиламино, диалкиламино;

R ' - это H, алкил, или замещенный алкил;

R " - это H, или

R ' и R " взяты вместе, чтобы сформировать гетероциклическое кольцо;

[1190] Z и Z' выбираются независимо из группы, состоящей из водород, алкил, замещенный алкил, Арил, замещенный Арил, арилалкил, замещенный арилалкил, гетероарил, замещенный гетероарил, гетероарилалкил, замещенный гетероарилалкил, алкокси, замещенный алкокси, аминокарбонил, алкоксикарбонил, карбоксилсульфонил, метансульфонил и замещенный или незамещенный алкилкарбонил, арилкарбонил, аралкилкарбонил, гетероарилкарбонил, гетероаралкилкарбонил, алкилкарбонилокси, арилкарбонилокси, аралкилкарбонилокси, гетероарилкарбонилокси, гетероаралкилкарбонилокси, алкиламинокарбонилокси, ариламинокарбонилокси, формил, левэралкилкарбонил, левэралкоксикарбонил, аминокарбонил, aminoарил, алкилсульфонил, сульфониамидо, aminoалкокси, алкиламино, гетероариламино, алкилкарбониламино, алкиламинокарбониламино, ариламинокарбониламино, аралкилкарбониламино, гетероарилкарбониламино, арилкарбониламино, циклоамидино, циклоалкил, циклоимино, арилсульфонил и арилсульфониамидо; или

[1191] Z и Z' взяты вместе, чтобы сформировать гетероциклическую группу, которая может могут быть необязательно замещены и таутомеры, и фармацевтически приемлемые соли, сложные эфиры или их пролекарства.

[1192] дальнейшие соединения SMIP описаны ниже и в патенте США применение Ser. No. 10/762, 873, применение соединений Триптантрина для иммунной защиты Потенциация, поданная на 1 января. 21, 2004 и раскрывая общее варианты осуществления соединений, представленных формулой (d): # # STR5## где

[1193] A, B, C, D, E, F, G, и H независимо выбраны от углерода и азот, или A и B и/или C и D можно принять совместно для того чтобы быть азот или сера;

[1194] R. sub.1, R. sub.2, R. sub.3, R. sub.4, R. sub.8, и P. sub.10 из них: независимо выбранный от группы состоя из водопода, галоида, низший алкил, алкил, замещенный алкил, циклоалкил, гетероцикл, алкилгетероцикл, замещенный гетероцикл, замещенный алкил, amino, (замещенный алкил) (алкил)амино, имино, галоловералкил, гидроксид, алкокси, замещенные алкокси, гидроксилалкилтио, нитро, алкилсульфонил, N-алкилсульфониамид,

арилалкил, арилалкиларил, ариларил, арилокси, ариламино, ациламино, ацилоксиамино, алкиламиноациламино, алкиламиносульфониламино, алкиламино, алкениламино, диалкиламино, алкоксиалкиламино, алкоксиалкилгетероцикл, меркаптоалкоксиалкил, циано, формил, --COOR.SUB.11 где R. sub.11-водород, левэралкил, Арил, гетероцикл, моносахарид или дисахарид, и -- CONR.SUB.12P. sub.13 где R. sub.12 и P. sub.13 независимо выбраны от водопода, низший алкил, Арил, гетероцикл, сахарид, пептид и аминокислота остатки; или R. sub.2 и P. sub.3 взятые вместе образуют шесть членов ароматическое кольцо;

[1195] R. sub.7 и P. sub.9 независимо выбраны от водопода, галоген, низший алкил, галовералкил, циклоалкил, гетероцикл, замещенный гетероцикл или гетероциклизалкил; и

[1196] R. sub.1, R. sub.2, R. sub.3, R. sub.4, R. sub.7, R. sub.8, R. sub.9, и R. sub.10 отсутствуют, когда кольцо атома, к которому они в противном случае были бы скрепленный сера или двойн-скрепленный азот; или

[1197] а фармацевтически приемлемые соли, сложные эфиры или пролекарства одного при условии, что P. sub.1, R. sub.2, R. sub.3, R. sub.4, R. sub.7, R. sub.8, R. sub.9, и P. sub.10 не весь водород когда А, В, С, D, E, F и Н - это углерод.

[1198] в одном варианте осуществления соединения Формулы (I) имеют остов структура, где D-азот, а А-С и Е-Н-углерод.

[1199] в одном варианте осуществления, когда D-углерод, по крайней мере один или по крайней мере два из p. sub.1--R. sub.4, и P. sub.7--R. sub.10 - это не водород.

[1200] в одном варианте осуществления, R. sub.1 через R. sub.4, и P. sub.8 и R. sub.10 из них выбираются независимо по крайней мере от двух членов группы состоит из водорода, галогена, низшего алкила, циклоалкила, гетероцикла, замещенный гетероцикл, алкилгетероцикл, amino, имино, галовералкил, алкокси, нитро, алкилсульфонил, арилалкил, арилалкиларил, ариларил, арилокси, ариламино, ациламино, ацилоксиамино, алкиламиноациламино, алкиламиносульфониламино, алкиламино, алкениламино, диалкиламино, алкоксиалкиламино, алкоксиалкилгетероцикл, меркаптоалкоксиалкил, циано, формил, --COOR.SUB.11 где R. sub.11 is водород, низший алкил, Арил, гетероцикл, моносахарид или дисахарид, и-Прим.SUB.12P. sub.13 где R. sub.12 и P. sub.13 находятся самостоятельно выбранный из водорода, низшего алкила, Арила, гетероцикла, сахара, пептидные и аминокислотные остатки; и R. sub.4 отсутствует, когда D есть азот.

[1201] в дополнительном варианте осуществления 4А, В, С, D, E, F, G и Н являются независимо выбранный от углерода и азота;

[1202] R. sub.1, R. sub.2, R. sub.3, R. sub.4, R. sub.8 и P. sub.10 из них: независимо выбранный от группы состоя из водопода, галоида, низший алкил, алкил, замещенный алкил, гетероцикл, замещенный гетероцикл, замещенный алкенил, (замещенный алкил) (алкил)амино, галовералкил, гидрокси, алкокси, замещенный алкокси, гидроксикалцитио, нитро, N-алкилсульфонамид, циано, --COOR.SUB.11 где R. sub.11 is водород, низший алкил, Арил, гетероцикл, моносахарид или дисахарид, и-Прим.SUB.12P. sub.13 где R. sub.12 и P. sub.13 находятся самостоятельно выбранный из водорода, низшего алкила, Арила, гетероцикла, сахара, пептидные и аминокислотные остатки.

[1203] для соединений, описанных здесь:

[1204] термин "loweralkyl" относится к разветвленной или прямой цепи ациклические алкильные группы, содержащие от одного до десяти атомов углерода, в том числе, например, метил, этил, пропил, изопропил, Н-бутил, Т-бутил, неопентил и подобный.

[1205] термин "алкил" относится к алкильным группам, которые не содержат гетероатомы. Таким образом, термин включает прямые цепные алкильные группы, такие как метил, этил, пропил, бутил, пентил, гексил, гептил, октил, нонил, децил, ундецил, додецил и тому подобное. Фраза также включает в себя разветвленную цепь изомеры алкильных групп прямой цепи, в том числе, но не ограничиваясь, в качестве примера можно привести следующие примеры: --CH(CH.SUB.3).SUB.2, -- CH(CH.SUB.3) (ч.SUB.2CH.SUB.3), --CH(CH.SUB.2CH.SUB.3).SUB.2, -- C(ч.SUB.3).SUB.3, --C (ГЛ.SUB.2CH.SUB.3).SUB.3, --ГЛ.SUB.2Ч(Ч.SUB.3).SUB.2, --ч.SUB.2Ч(Ч.SUB.3) (ч.SUB.2CH.SUB.3), --ГЛ.SUB.2Ч(Ч.SUB.2CH.SUB.3).SUB.2, -- ч.SUB.2C(Ч.SUB.3).SUB.3, --ГЛ.SUB.2C(Ч.SUB.2CH.SUB.3).SUB.3, -- CH(CH.SUB.3) Ч(Ч.SUB.3) (ч.SUB.2CH.SUB.3), -- ГЛ.SUB.2CH.SUB.2Ч(Ч.SUB.3).SUB.2, --ГЛ.SUB.2CH.SUB.2Ч(Ч.SUB.3) (ч.SUB.2CH.SUB.3), --ГЛ.SUB.2CH.SUB.2Ч(Ч.SUB.2CH.SUB.3).SUB.2, -- ГЛ.SUB.2CH.SUB.2C(Ч.SUB.3).SUB.3, --ГЛ.SUB.2CH.SUB.2C(Ч.SUB.2CH.SUB.3), -- CH(CH.SUB.3) ч.SUB.2Ч(Ч.SUB.3).SUB.2, -- CH(CH.SUB.3) Ч(Ч.SUB.3) Ч(Ч.SUB.3).SUB.2, -- CH(CH.SUB.2CH.SUB.3) Ч(Ч.SUB.3) Ч(Ч.SUB.3) (ч.SUB.2CH.SUB.3), и Прочее. Термин также включает циклические алкильные группы, такие как циклопропил, циклобутил, циклопентил, циклогексил, циклогептил и циклооктил и тому подобное кольца, замещенные прямыми и разветвленными цепными алкильными группами, как определено выше. Термин также включает полициклические алкильные группы, такие как, но не ограничиваясь этим, адамантил норборнил и бицикло [2.2.2]октил и тому подобное кольца, замещенные прямыми и разветвленными цепными алкильными группами, как определено выше. Таким образом, фраза незамещенные алкильные группы включает в себя первичные алкильные группы, вторичные алкильные группы и третичные алкильные группы. Незамещенные алкильные группы могут быть связаны с одним или несколькими атомами углерода(s), атом (ы) кислорода, атом(ы) азота и / или атом (ы) серы в родителе соединение. Предпочтительные незамещенные алкильные группы включают прямые и алкильные группы С разветвленной цепью и циклические алкильные группы, содержащие от 1 до 20 углерода атомы. Более предпочтительными такие незамещенные алкильные группы имеют от 1 до 10 атомы углерода в то время как еще более предпочтительными такие группы имеют от 1 до 5 углеродистых атомов. Наиболее предпочтительными незамещенными алкильными группами являются прямые и разветвленные цепные алкильные группы, имеющие от 1 до 3 атомов углерода и включите метил, этил, пропил, и --CH(CH.SUB.3).SUB.2.

[1206] выражение "замещенный алкил" относится к незамещенному алкилу группа, определенная выше, в которой одна или несколько связей с углеродом (углеродами) или водород (ы) замещаются связью с неводородными и неуглеродными атомами как, но не ограниченный к, атом галоида в галоида как F, Cl, Br, и я; атом фосфора в группах, таких как фосфат и диалкил алкилфосфонат; атом кислорода в группах, таких как гидроксильные группы, алкокси группы, арилокси группы и эфирные группы; атом серы в таких группах, как тиольные группы, алкильные и арилсульфидные группы, сульфонные группы, сульфонила группы и сульфоксидные группы; атом азота в группах, таких как амины, амиды, алкиламины, диалкиламины, ариламины, алкилариламины, диариламины, N-оксиды, имиды и эмалины; атом кремния в группах например, в триалкилсилильных группах, диалкиларилсилильных группах, алкилдиарилильных группы и триарилильных группы; и другие гетероатомы в различных других группах. Замещенные алкильные группы также включают группы в которая одна или несколько связей с атомом углерода(ов) или водорода(ов) заменяется на связь с гетероатомом, таким как кислород в карбониле, карбоксильном и сложном эфире группы; азот в группах как имины, оксими, гидразоны, и НИТРИЛЫ. Предпочтительные замещенные алкильные группы включают, в частности, алкил группы, в которых одна или более связей с атомом углерода или водорода является / являются замещается одной или несколькими связями с атомами фтора. Один из примеров а замещенная алкильная группа представляет собой трифторметильную группу и другой алкил группы, содержащие трифторметильную группу. Другие алкильные группы включают те, в которых одна или несколько связей с атомом углерода или водорода заменены по связи с атомом кислорода такой, что замещенная алкильная группа содержит гидроксильную, алкоксильную, арилоксильную или гетероциклоксильную группы. Еще другие алкильные группы включают алкильные группы, которые имеют Амин, алкиламин, диалкиламин, ариламин, (алкил) (Арил)Амин, диариламин, гетероцикламин, (алкил) (гетероцикл) Амин, (Арил) (гетероцикл)Амин, или группа дигетероцикламина.

[1207] термин "алкокси" относится к RO-- где R, например, является алкилом такие как loweralkyl, определенный выше. Репрезентативные примеры loweralkyl алкоксильные группы включают метокси, этокси, Т-бутокси и тому подобное.

[1208] фраза "замещенный алкокси" относится к RO--, где R означает, для например, алкил, замещенный, например, галогеном. RO - это для пример OCF.SUB.3.

[1209] термин "алкенил" относится к разветвленным или прямоцепным группам содержащий от двух до двадцати атомов углерода, который также содержит один или более углерод-двойные связи углерода. Репрезентативные алкенильные группы включают пренил, 2-пропенил (т. е. аллил), 3-метил-2-бутенил, 3,7-диметил-2,6-октаденил, 4,8 - диметил-3,7-неадиенил, 3,7,11-триметил-2,6,10-додекатриенил и тому подобное.

[1210] выражение "замещенный алкенил" относится к алкенильным группам, которые являются замещенный, например, диэтиловым гекс-5-енилфосфонатом, и другие с алкильная или замещенная алкильная группа, такая как диалкилфосфат или сложный эфир как укусный эфир.

[1211] фраза "диалкиламино" относится к замещенной аминогруппе с двумя алкильными группами, такими как C1-20 алкильные группы.

[1212] фраза "замещенный диалкиламино" относится к диалкиламино замещенные, например, карбоновой кислотой, сложным эфиром, гидроксид или алкокси.

[1213] термин "гидроксиалкилтио" относится к Тио-радикалу, который является добавлена гидроксиалкильная группа, где алкил, например, ниже алкил. Примером может служить гидроксиэтилтио, --SCH.SUB.2CH.SUB.2OH.

[1214] термин "N-алкилсульфонамид" относится к группе --TAK.SUB.2нхалкил, где алкил-это, например, октил.

[1215] термин "алкинил" относится к разветвленной или прямой цепи содержащий от двух до двадцати атомов углерода, который также содержит один или более тройные связи углерод-углерод. Репрезентативные алкинильные группы включают этинил, 2-пропинил (пропаргил), 1-пропинил и тому подобное.

[1216] термин "Арил" относится к арильным группам, которые не содержат гетероатомы. Таким образом, этот термин включает, но не ограничивается такими группами, как как фенил, бифенил, антрацен, нафенил в качестве примера. Хотя фраза "незамещенный Арил" включает группы, содержащие конденсированные соединения кольца как нафталин, оно не включает арильные группы которые имеют другие группы, такие как алкильные или гало-группы, связанные с одним из колец члены, поскольку арильные группы, такие как толил, считаются здесь замещенные арильные группы, как описано ниже. А предпочтительный незамещенный продукт арильная группа-это фенил. Незамещенные арильные группы могут быть присоединены к одной или больше атомов углерода, кислорода, азота и / или серы атом (ы) в Родительском соединении, однако.

[1217] выражение "замещенная арильная группа" имеет то же значение, что и отношение к арильным группам, которые замещенные алкильные группы имели в отношении алкильная группа. Однако замещенная арильная группа также включает арильные группы в котором один из ароматических углей связан с одним из неуглеродистых или не-атомы водорода описанные выше и также включают арильные группы внутри какие один или несколько ароматических углей арильной группы связаны с а замещенная и / или незамещенная алкильная, алкенильная или алкинильная группа в качестве определено здесь. Это включает в себя связующие устройства, в которых два углерода атомы арильной группы связаны с двумя атомами алкила, алкенила или алкинильная группа для определения системы плавного кольца (например, дигидронафтил или тетрагидронафтил). Таким образом, фраза "замещенный Арил" включает, но является не ограничиваясь толилом и гидроксифенилом среди других.

[1218] термин "арилалкил" относится к низшему радикалу алкила, который является добавлена арильная группа. Репрезентативные арилалкильные группы включают бензил, фенилэтил, гидроксibenзил, фторбензил, фторфенилэтил и тому подобное.

[1219] выражение "нерафинированный ариларил" относится к группе или заместителю к которые две арильные группы, которые не конденсируются друг к другу, связаны. Образцовые нерафинированные ариларильные соединения включают, например, фенилбензол, дифенилдиазен, 4-метилтио-1-фенилбензол, феноксibenзол, (2-фенилэтинил)бензол, дифенилкетон, (4-фенилбута-1,3-динил)бензол, фенилбензиламин, (фенилметокси) бензол и тому подобное. Предпочтительный замещенный нерастворенный ариларильные группы включают: 2-(фениламино) - N - [4-(2-фенилэтинил)фенил]ацетамид, 1,4-дифенилбензол, N-[4-(2-фенилэтинил)фенил]-2 - [бензиламино]ацетамид, 2-амино-N - [4-(2-фенилэтинил)фенил]пропанамида, 2-амино-N - [4-(2-фенилэтинил)фенил]ацетамид, 2-(циклопропиламино) - N - [4-(2-фенилэтинил)фенил]ацетамид, 2-(этиламино)-N-[4-(2-фенилэтинил)фенил]ацетамид, 2 - [(2-метилпропил)амино] - N - [4-(2-фенилэтинил)фенил]ацетамид, 5-фенил-2Н-бензо[d]1,3-диоксолен, 2-хлор-1-метокси-4-фенилбензол, 2 - [(имидазолилметил)амино] - N - [4-(2-фенилэтинил)фенил]ацетамид, 4-фенил-1-феноксibenзол, N-(2-аминоэтил)[4-(2-фенилэтинил)фенил]карбоксамид, 2 - [(4-фторфенил)метил]амино) - N - [4-(2-фенилэтинил)фенил]ацетамид, 2 - [(4-метилфенил)метил]амино) - N - [4-(2-фенилэтинил)фенил]ацетамид, 4-фенил-1 - (трифторметил)бензол, 1-бутил-4-фенилбензол, 2-(циклогексиламино) - N - [4-(2-фенилэтинил)фенил]ацетамид, 2-(этилметиламино) - N - [4-(2-фенилэтинил)фенил]ацетамид, 2-(бутиламино) - N - [4-(2-фенилэтинил)фенил]ацетамид, N - [4-(2-фенилэтинил)фенил]-2-(4-пиридиламино)ацетамид, N-[4-(2-фенилэтинил)фенил]-2-(хинуклидин-3-иламино)ацетамид, N - [4-(2-фенилэтинил)фенил]пирролидин-2-илкарбоксамид, 2-амино-3-метил-N - [4-(2-фенилэтинил)фенил]бутанамида, 4-(4-фенилбута-1,3-динил)фениламин, 2-(диметиламино) - N - [4-(4-фенилбута-1,3-динил)фенил]ацетамид, 2-(этиламино) - N - [4-(4-фенилбута-1,3-динил)фенил]ацетамид, 4-этил-1-фенилбензол, 1 - [4 - (2-фенилэтинил)фенил]Этан-1-он, N-(1-карбамоил-2-гидроксипропил)[4-(4-фенилбута-1,3-динил)фенил]карбоксамид - МИД, N - [4 - (2-фенилэтинил)фенил]пропанамида, 4-метоксифенилфенил кетон, фенил-N-бензамид, (трет-бутоксид) - N - [(4-фенилфенил)метил]карбоксамид, 2-(3-фенилфеноксид)этангидроксамовая кислота, 3-фенилфенилпропаноат, 1-(4-этоксифенил) - 4-метоксibenзол, и [4-(2-фенилэтинил)фенил]пиррол.

[1220] выражение "нерафинированный гетероариларил" относится к нерафинированному ариларилу группа, в которой одна из арильных групп является гетероарильной группой. Образцовый гетероариларильные группы включают, например, 2-фенилпиридин, фенилпиррол, 3-(2-фенилэтинил) пиридин, фенилпирозол, 5-(2-фенилэтинил) - 1,3-дигидропиримидин-2,4-Дион, 4-фенил-1,2,3-тиадиазол, 2-(2-фенилэтинил)пиразин, 2-фенилтиофен, фенилимидазол, 3-(2-пиперазинилфенил)фуран, 3-(2,4-дихлорфенил)-4-метилпиррол и тому подобное. Предпочтительный замещенные нерастворенные гетероариларильные группы включают: 5-(2-фенилэтинил)пиримидин-2-иламин, 1-метокси-4-(2-тиенил)бензол, 1-метокси-3-(2-тиенил)бензол, 5-метил-2-фенилпиридин, 5-метил-3-фенилизоксазол, 2-[3 - (трифторметил)фенил]фуран, 3-фтор-5 - (2-фурил) - 2-метокси-1-проп-2-енилбензол, (гидроксиимино) (5-фенил (2-тиенил)метан, 5 - [(4-метилпиперазинил)метил] - 2-фенилтиофен, 2-(4-этилфенил)тиофен, 4-метилтио-1-(2-тиенил)бензол, 2-(3-нитрофенил)тиофен, (трет-бутоксид) - N - [(5-фенил(3-пиридил)) метил]карбоксамид, гидрокси-N - [(5-фенил(3-пиридил)) метил]Амид, 2 - (фенилметилтио)пиридин и бензилимидазол.

[1221] выражение "нерафинированный гетероарилгетероарил" относится к нерафинированному гетероарилу. ариларильная группа, где обе арильные группы являются гетероарильной группой. Примерные гетероарилгетероарильные группы включают, например, 3-пиридилимидазол, 2-имидазолилпиразин и тому подобное. Предпочтительный замещенные нерастворенные гетероарилгетероарильные группы включают: 2-(4-пиперазинил-3-пиридил)фуран, диэтил(3-пиразин-2-Ил (4-пиридил)) Амин и диметил {2 - [2-(5-метилпиразин-2-Ил)этинил] (4-пиридил)}Амин.

[1222] фраза "слитый ариларил" относится к арильной группе, как и ранее определено, что конденсируется и полностью сопряжена с арильной группой. Репрезентативные сплавленные ариларильные группы включают бифенил, 4-(1-нафтил)фенил, 4-(2-нафтил)фенил и тому подобное.

[1223] фраза "слитый гетероариларил" относится к арильной группе как предварительно определено, что конденсируется и полностью сопряжено с а гетероарильная группа. Репрезентативные сплавленные гетероариларильные группы включают хинолин, хиназолин и тому подобное.

[1224] фраза "слитый гетероарилгетероарил" относится к гетероарилу группа, как было определено ранее, которая конденсируется и полностью сопряжена с еще одна гетероарильная группа. Представитель сплавленного гетероарилгетероарил группы включают пиразолопиримидин, имидазохинолин и тому подобное.

[1225] термин "арилокси" относится к RO-где R-арильная группа. Репрезентативная арилалкокси группа включает бензилокси, фенилэтоксид и Нравится.

[1226] термин "арилалкокси" относится к низшему алкоксильному радикалу, к которому относятся: добавлена арильная группа. Представитель арилалкокси группы включают бензилокси, фенилэтоксид и тому подобное.

[1227] термин "арилоксиарил" относится к арильному радикалу, который является добавлена группа арилокси. Представитель арилоксиарильных групп включает 4-феноксифенил, 3-феноксифенил, 4-феноксид-1-нафтил, 3-феноксид-1-нафтил и тому подобное.

[1228] термин "арилоксиарилалкил" относится к арилалкильному радикалу, чтобы к которому прилагается группа арилокси. Представитель арилоксиарилалкила группы включают 4-феноксифенилметил, 3-феноксифенилметил, 4-феноксифенилэтил, 3-феноксифенилэтил и тому подобное.

[1229] термин "арилалкоксиарил" относится к арильному радикалу, который является добавлена группа арилалкокси. Представитель арилалкоксиарильных групп включают 4-бензилоксилфенил, 3-бензилоксифенил и тому подобное.

[1230] термин "арилалкоксиарилалкил" относится к арилалкильному радикалу, чтобы который добавляется арилалкокси группа. Представитель арилалкоксиарилалкил группы включают 4-бензилоксилбензил, 3-бензилоксифенил и тому подобное.

[1231] термин "циклоалкил" относится к алициклической группе, содержащей от От 3 до 7 атомов углерода включая, но не ограничиваясь, циклопропил, циклобутил, циклопентил, циклогексил и тому подобное.

[1232] термин "циклоалкилалкил" относится к низшему радикалу алкила, к которому добавляется циклоалкильная группа. Репрезентативные примеры циклоалкилалкил включает циклопропилметил, циклогексилметил, 2 - (циклопропил)этил и тому подобное.

[1233] термин "галоген" относится к йоду, Бром, хлору или фтор; "ореол" означает йод, бром, хлор или фтор.

[1234] термин "галоалкил" относится к низшему алкильному радикалу, как он определен выше, несущ по крайней мере один заместитель галоида, например, хлорметил, фторэтил или трифторметил и тому подобное.

[1235] термин "гетероциклический" (или гетероциклический, или гетероцикло) относится как к ароматическим, так и к неароматическим кольцевым соединениям, включая моноциклические, бициклические и полициклические кольцевые соединения, такие как, но не ограничиваясь ими, хинуклидил, содержащий 3 или более кольцевых элементов, из которых один или более является а гетероатом таких как, но не ограничиваясь, N, O и S. Хотя фраза "незамещенный гетероцикл" включает конденсированные гетероциклические кольца, такие как как бензимидазол, он не включает гетероциклические группы которые имеют другие группы, такие как алкильные или гало-группы, связанные с одним из колец элементы в качестве соединений, таких как 2-метилбензимидазол, замещены гетероциклические группы. Примеры гетероциклических групп включают, но не являются таковыми ограничено: ненасыщенные 3 до 8 членных колец, содержащих от 1 до 4 азота атомы как, но не ограниченный к пирролил, пирролинил, имидазол, пиразолил, пиридил, дигидропиридил, пиримидил, пиразинил, пиридазинил, триазолил (например, 4Н-1,2,4-триазолил, 1Н-1,2,3-триазолил, 2Н-1,2,3-триазолил и др.), тетразолил (например, 1Н-тетразолил, 2Н-тетразолил, и т.д.); насыщенные от 3 до 8 членных колец, содержащих от 1 до 4 атомов азота такие как, но не ограничиваясь, пирролидинил, имидазолидинил, пиперидинил, пиперазинил; конденсированные ненасыщенные гетероциклические группы, содержащие от 1 до 4 атомы азота как, но не ограниченный к, индолил, изоиндолил, индолинил, индолизинил, бензимидазол, хинолил, изохинолил, индазолил, бензотриазолил; ненасыщенные 3-8 членные кольца, содержащие от 1 до 2 атомы кислорода и от 1 до 3 атомов азота, такие как, но не ограничиваясь ими, оксазолил, изоксазолил, оксадиазолил (например, 1,2,4-оксадиазолил, 1,3,4-оксадиазолил и др.); насыщенные от 3 до 8 членов кольца, содержащие от 1 до 2 атомов кислорода и от 1 до 3 атомов азота, такие как, но не ограничиваясь, морфолинил; ненасыщенные конденсированные гетероциклические группы, содержащие от 1 до 2 атомов кислорода и от 1 до 3 атомов азота, для например, бензоксазолил, бензоксадиазолил, бензоксазинил (например 2Н-1,4-бензоксазинил и др.); ненасыщенные 3 до 8 членных колец, содержащих 1 до 3 атомов серы и от 1 до 3 атомов азота-например, но не ограничиваясь ими, тиазолил, изотиазолил, тиadiaзолил (например, 1,2,3-тиadiaзолил, 1,2,4-тиadiaзолил, 1,3,4-тиadiaзолил, 1,2,5-тиadiaзолил и др.); насыщенные 3 до 8 членных колец, содержащих от 1 до 2 атомов серы и от 1 до 3 атомы азота как, но не ограниченный к, тиазололидинил; насыщенный и ненасыщенные 3-8 членные кольца, содержащие от 1 до 2 атомов серы, такие как, но не ограничиваясь этим, тиенил, дигидродитиенил, дигидродитионил, тетрагидротиофен, тетрагидротиопиран; ненасыщенные конденсированные гетероциклические кольца, содержащие от 1 до 2 атомов серы и от 1 до 3 атомов азота атомы как, но не ограниченный к, бензотиазолил, бензотиadiaзолил, бензотиазинил (например, 2Н-1,4-бензотиазинил и др.), дигидробензотиазинил (например, 2Н-3,4-дигидробензотиазинил и др.), ненасыщенные от 3 до 8 членов кольца, содержащие атомы кислорода, такие как, но не ограничиваясь фурил; ненасыщенные конденсированные гетероциклические кольца, содержащие от 1 до 2 атомов кислорода как бензодиоксолил (например 1,3-бензодиоксоил, ЕТК.); ненасыщенные от 3 до 8 членные кольца, содержащие атом кислорода и от 1 до 2 атомов серы, такие как, но не ограничиваясь этим, дигидроксатинил; насыщенные от 3 до 8 членных колец содержащий от 1 до 2 атомов кислорода и от 1 до 2 атомов серы, таких как 1,4-оксатан; ненасыщенные конденсированные кольца, содержащие от 1 до 2 атомов серы как бензотиенил, бензодитиенил; и unsaturated сконденсированный гетероциклические кольца, содержащие атом кислорода и от 1 до 2 таких атомов кислорода как бензоксатинил. Гетероциклические группы также включают в себя те, которые описаны выше в котором один или более атомов S в кольце дважды связаны с одним или двумя атомы кислорода (сульфоксиды и сульфоны). Например, гетероциклические группы включите тетрагидротиофен, окис тетрагидротиофена, и тетрагидротиофен 1,1-диоксид. Предпочтительные гетероциклические группы содержат 5 или 6 кольцевых элементов. Более предпочтительные гетероциклические группы включают морфолин, Пиперазин, пиперидин, пирролидин, имидазол, пиразол, 1,2,3-триазол, 1,2,4-триазол, тетразол, тиоморфолин, тиоморфолин, в которых S атом тиоморфолина связан с одним или несколькими атомами о, пирролом, гомопиперазин, оксазолидин-2-он, пирролидин-2-он, оксазол, хинуклидин, тиазол, изоксазол, фуран и тетрагидрофуран.

[1236] фраза "замещенный гетероцикл" относится к гетероциклилу группа, как определено выше, в которой один из кольцевых элементов связан с а неводородный атом, такой как описано выше в отношении замещенных алкильные группы и замещенные арильные группы. Примеры включают, но не являются таковыми ограничено, 2-метилбензимидазолил, 5-метилбензимидазолил, 5-хлорбензотриазолил, 1-метилпиперазинил и 2-хлорпиридил в том числе Прочее.

[1237] "Аминосульфонил" относится к группе-S(O) 2-NH2. "Замещенный аминосульфони́л" относится к группе --S (O).SUB.2--NRR', где R loweralkyl и R ' - это водород или нижний алкил. Срок "аралкиламиносульфонил" относится к группе - Арил-S (O).SUB.2--NH-аралкил, где аралкил-это низший аралкил.

[1238] "Карбонил" относится к двухвалентной группе --C(O)--.

[1239] "Карбонилокси" обычно относится к группе --C(O)--O--. Такой группы включают сложные эфиры, --C (O)--O--R, где R-низший алкил, циклоалкил, Арил, или нижний алкил. Термин "карбонилоксидциклоалкил" относится в целом как к "карбонилоксидкарбоциклоалкилу", так и к "карбонилоксидгетероциклоалкилу", т. е., где R-карбоциклоалкил или гетероциклоалкил, соответственно. Термин "арилкарбонилокси" относится к Группа --C (O)--O-Арил, где Арил представляет собой моно-или полициклический карбоциклоарил или гетероциклоарил. Термин "аралкилкарбонилокси" относится к этой группе --C (O)--O-аралкил, где аралкил-это низший аралкил.

[1240] термин "сульфонил" относится к группе --так.SUB.2-- "Алкилсульфонил" относится к замещенному сульфони́лу структуры --ТАК.SUB.2R-- в котором R является алкилом. Алкилсульфонильные группы, используемые в соединения настоящего изобретения обычно представляют собой низший алкилсульфонил группы, имеющие от 1 до 6 атомов углерода в своей основной структуре. Таким образом, типичные алкилсульфонильные группы, используемые в соединениях настоящего времени изобретение включает, например, метилсульфонил (т. е., где R-метил), этилсульфонил (т. е., где R-этил), пропилсульфонил (т. е., где R - пропил), и тому подобное. Термин "арилсульфонил" относится к данной группе --ТАК.SUB.2-Арил. Термин "аралкилсульфонил" относится к этой группе --ТАК.SUB.2-аралкил, в котором аралкил является низшим алкилом. Срок "сульфонамидо" относится к --так.SUB.2NH.SUB.2.

[1241] термин "карбониламино" относится к двухвалентной группе --NH--C(O)-- в которой атом водорода Амида азота карбониламино группа может быть заменена на более низкую алкильную, арильную или более низкую алкильную группу. Такой группы включают в себя Фратрии, такие как сложные эфиры карбамата (--NH--C(O)--O--R) и амиды -- NH--C (O)--O--R, где R-прямая или разветвленная цепь низший алкил, циклоалкил, Арил или низший алкил. Срок "loweralkylcarbonylamino" относится к алкилкарбониламино, где R - это а низший алкил, имеющий от 1 до около 6 атомов углерода в своем осто́ве структура. Термин "арилкарбониламино" относится к группе --NH--C (O)--R где R-Арил. Аналогичным образом, термин "аралкилкарбониламино" относится к карбониламино, где R-низший аралкил.

[1242] термин "гуанидино" или "гуанидил" относится к фратриям, полученным из гуанидин, H2N--C(.dbd.NH)--NH.SUB.2. К таким фратриям относятся

те, которые связаны на атоме азота нося официально двойную связь ("2" - положение гуанидин, например, диаминометиленамино, (H2N).SUB.2C.dbd.NH--) и те скрепленные на любом из атомов азота нося формальное одиночное Бонд ("1 - "и/или"3" -позиции гуандина, например, H. sub.2N--C(.dbd.NH)--NH--). Атомы водорода в любом из нитрогенов может быть заменен на подходящий заместитель, такой как loweralkyl, Арил, или Нижний алкил.

[1243] репрезентативные циклоимидные и гетероциклоимидные группы включают, например: пример, показанный ниже. Эти циклоимидо и гетероциклоимидо могут быть далее подставляются и могут быть прикреплены на различных позициях, как это будет очевидно для тех, кто имеет навыки в органической и медицинской химии искусство в сочетании с раскрытием в настоящем документе. ##STR6##

[1244] представитель замещенных амидино-и гетероциклоамидиногрупп включите, например, те, которые показаны ниже. Эти amidino и группы гетероциклоамидино могут быть дополнительно замещены, как это будет очевидно для тех, кто имеет навыки в области органической и медицинской химии искусств в в сочетании с настоящим Положением о раскрытии информации. ##STR7##

[1245] представитель замещенного алкилкарбониламино, алкилоксикарбониламино, аминоксикарбониламино и арилкарбониламино группы включают, например, те, которые показаны ниже. Эти группы могут быть далее подставляются, как будет видно тем, кто обладает навыком в области органическая и медицинская химия искусство в сочетании с раскрытием здесь. ##STR8##

[1246] репрезентативные замещенные аминокарбонильные группы включают, например: пример, показанный ниже. Это могут быть гетероцикловые группы в дальнейшем заменено как будет очевидно к тем имея искусство в органическом и медицинская химия искусство в сочетании с раскрытием здесь. ##STR9##

[1247] репрезентативные замещенные алкоксикарбонильные группы включают, например: пример, показанный ниже. Эти алкоксикарбонильные группы могут быть и дальше заменено как будет очевидно к тем имея искусство в органическом и медицинская химия искусство в сочетании с раскрытием здесь. ##STR10##

[1248] "замещенный" относится к определенному замещению водорода с помощью один или несколько одновалентных или двухвалентных радикалов. Подходящие группы замещения включают в себя, описанные здесь для конкретных групп, а также гидроксил, нитро, amino, имино, циано, гало, Тио, тиоамидо, амидино, имидино, оксо, оксамидино, метоксамидино, имидино, гуанидино, сульфониамидо, карбокс, формил, алкил, замещенный алкил, галоловералкил, низший алкокси, галоловералкокси, низший оксиалкил, алкилкарбонил, арилкарбонил, араилкарбонил, гетероарилкарбонил, гетероаралкилкарбонил, алкилтио, аминоалкил, цианоалкил, бензил, пиридил, пиразолил, пиррол, тиофен, имидазолил и тому подобное.

[1249] термин "связывающая мойета" относится к ковалентной связи или связывающему элементу. незациклированная двухвалентная группа, такая как, например, --CO--, --O--, --S--, --ГЛ.SUB.2--, --NH--, а также замещенный или незамещенный алкил, алкенил, алкинильные, карбонильные, алкоксикарбонильные группы, определенные в настоящем документе.

[1250] термин "соединение SMIP" относится к малой молекуле иммунопотенцирующие соединения, которые включают в себя мелкомолекулярные соединения ниже около MW 1000 г / моль, предпочтительно MW 800 г / моль, которые способны стимулировать или модуляция провоспалительной реакции у пациента. В Ан варианты осуществления, соединения SMIP способны стимулировать периферическую активность человека мононуклеарные клетки крови вырабатывают цитокины. Предпочтительные соединения SMIP и их производные включают, например, аминоксикарбонильные соединения, бензасольные соединения, ацилпиперазиновые соединения, индолдионовые соединения, соединения тетрагидроизохинолина (THIQ), соединения антрахинона, индандионовые соединения, пталимидные соединения, бензоциклодионовые соединения, соединения аминоксикарбонильные соединения, соединения аминобензимидазола хинолинона (ABIQ), гидрафталамида соединения, пиразолопиримидиновые соединения, хиназилиновые соединения, соединения хиноксалина, соединения триазина, тетрагидропирролидинохиноксалиновые соединения, пиррольные соединения, соединения бензофенона, соединения стерола и соединения изоксазола.

[1251] термин "соединение SMIS" относится к малой молекуле иммуносупрессорные соединения, которые включают в себя соединения малых молекул ниже около около MW 1000 g/mol, предпочтительно MW 800 g / mol, способный на подавление или модуляция провоспалительной реакции у пациента.

[1252] Ацилпиперазиновые соединения, описанные в настоящем приложении включают соединения формулы (III) , как показано ниже: ## STR11## где, [1253] R. sub.9 выбирается из группы, состоящей из замещенных или незамещенный Арил, гетероарил, арилалкил, арилалкенил, гетероарилалкил и гетероарилалкенил; [1254] R. sub.10 заменяется или незамещенный алкил; [1255] n-целое число от 0-2; и [1256] если D. sub.1-это углерод, чем D. sub.2-это кислород, D. sub.3 отсутствует, и D. sub.4 выбирается из группы, состоящей из замещенных или незамещенный Арил, гетероарил, карбоцикл, алкоксиарил, плавный арилалкил, слитый арилгетероарил и слитый гетероарилалкил; или [1257], если D. sub.1 это азот, чем D. sub.2-это азот, D. sub.4 отсутствует и D. sub.3 is выбранный из группы, состоящей из замещенного или незамещенного Арила, гетероарил, карбоцикл, алкоксиарил, плавный арилалкил, слитый арилгетероарил, и слитый гетероарилалкил.

[1258] Индолдионовые соединения, описанные в этом приложении включают соединения формулы (IV) , как показано ниже: ## STR12## где, [1259] R. sub.11 и P. sub.12 выбираются из группы самостоятельно состоящий из H, нитро, галоген, amino, гидроксид, циано, карбоксидициклический кислота, а также замещенный или незамещенный алкил, Арил, гетероарил, алкокси, алкилкарбонил, алкилкарбониламино, алкиламинокарбонил, аминокарбонил, арилалкокси, гетероарилалкокси, алкиламино, арилалкиламино, ариламино, гетероариламино, гетероариламиноалкил, гетероцикл, гетероциклиалкокси, гетероциклиалкильные и карбоциклильные группы; и, [1260] R. sub.13 is выбранный из группы, состоящей из замещенного или незамещенного Арила, гетероарил, арилалкил, гетероарилалкил, гетероцикл, гетероциклиалкил, и алкилбензил.

[1261] Тетрагидроизохинолиновые (THIQ) соединения, описанные повсюду это приложение включает в себя соединения формулы (V) , как показано ниже: ##STR13## где, [1262] L-ковалентная связь или выбранная из числа группа, состоящая из --CH.SUB.2--, --CO--, -- O--, --S--, CHF, --NH--, -- HP. sub.20--, где R. sub.20-низший алкил; [1263] R. sub.14 is выбранный из группы, состоящей из водорода, галогена и замещенных или незамещенный алкил; [1264] R. sub.15 выбирается из группы состоящий из замещенного или незамещенного карбоцикла, Арила, арилалкила, алкоксиарил, гетероарил, гетероцикл; [1265] R. sub.16 выбирается из группа, состоящая из водорода, галогена и замещенных или незамещенный алкил; [1266] R. sub.17 выбирается из группы состоящий из водорода, галогена и замещенного или незамещенного алкила; и, [1267] P. sub.18 и P. sub.19 независимо выбраны от группа, состоящая из H, гидроксид, галоген, алкокси, amino, незамещенных алкил, замещенный алкил и алкиламино.

[1268] Бензоциклодионовые соединения, описанные в настоящем приложении включают соединения формулы (VI) , как показано ниже: ## STR14## где, [1269] E выбирается из группы, состоящей из NR.sub.25 или CR.SUB.26. sub.27; [1270] R. sub.21, R. sub.23, и P. sub.24 из них: независимо выбранный от группы состоя из H, Оксид, галоид, алкокси, amino, незамещенный алкил, замещенный алкил и алкиламино; [1271] R. sub.22 выбрано от группы состоя или H, Оксид, галоген, алкокси, amino и незамещенный или замещенный алкил, а также алкиламино, арилалкил, гетероарилалкил, Арил, гетероарил, арилкарбонил, гетероцикл, гетероциклиалкил и гетероарилкарбонил; [1272] R. sub.25 выбирается из группы, состоящей из замещенных или незамещенный Арил, гетероарил, гетероцикл, карбоцикл, арилалкил, гетероарилалкил и гетероциклиалкил; [1273] R. sub.26 выбирается из группа, состоящая из H, галоген, гидроксид, amino и замещенных или незамещенный алкил, карбонилалкил и алкилкарбонилалкил; и, [1274] R. sub.27 выделяют из группы Арил, арилалкил, гетероарилалкил, гетероцикл, гетероциклиалкил, карбоцикл, арилкарбонилалкил и арилалкилкарбонил.

[1275] Аминоксикарбонильные соединения, описанные в настоящем приложении включают соединения формулы (VII) , как показано ниже: ## STR15## где, [1276] G-это либо S, либо NH; [1277] R. sub.28 выбирается из списка группа, состоящая из H и замещенного или незамещенного алкила, Арила, гетероарил, гетероарилалкил, арилалкил, карбоцикл, карбоциклиалкил, гетероцикл, и гетероциклиалкил; [1278] Q выбрано от группа, состоящая из водорода, замещенного алкила, незамещенного алкила и Арил, замещенный Арил, гетероарил, замещенный гетероарил, гетероцикл, замещенный гетероцикл, расплавленный или расплавленный арилалкил, замещенный арилалкил, арилгетероарил, замещенный арилгетероарил, гетероарилгетероарил и замещенный гетероарилгетероарил; [1279] V. sub.1 выбирают из группы, состоящей из алкила, замещенного алкил, Арил, замещенный Арил, арилалкил, замещенный арилалкил, гетероарил, замещенный гетероарил, гетероарилалкил, замещенный гетероарилалкил, алкокси, замещенный алкокси,

аминокарбонил, алкоксикарбонил, карбоксилсульфонил, метансульфонил и замещенные или незамещенный алкилкарбонил, арилкарбонил, араилкарбонил, гетероарилкарбонил, гетероараилкарбонил, алкилкарбонилокси, арилкарбонилокси, араилкарбонилокси, гетероараилкарбонилокси, гетероараилкарбонилокси, алкиламинокарбонилокси, ариламинокарбонилокси, формил, левалкарбонил, левалкоксикарбонил, аминокарбонил, аминоарил, алкилсульфонил, сульфонамидо, аминоалкокси, алкиламино, гетероариламино, алкилкарбониламино, алкиламинокарбониламино, ариламинокарбониламино, араилкарбониламино, араилкарбониламино, циклоамидо, арилсульфонил и арилсульфонамидо; и, [1280] V. sub.2 выбирается из группы состоящий из гидрида, галогена, алкила, замещенного алкила, Арила, замещенный Арил, араилалкил, замещенный араилалкил, гетероарил, замещенный гетероарил, гетероариалалкил, замещенный гетероариалалкил, алкокси, замещенный алкокси, аминокарбонил, алкоксикарбонил, карбокс сульфонил, метансульфонил и замещенный или незамещенный алкилкарбонил, арилкарбонил, араилкарбонил, гетероарилкарбонил, гетероариалкарбонил, алкилкарбонилокси, арилкарбонилокси, араилкарбонилокси, гетероариалкарбонилокси, гетероараилкарбонилокси, алкиламинокарбонилокси, ариламинокарбонилокси, формил, низший алкилкарбонил, loweralkoxycarbonyl, aminocarbonyl, aminoaryl, alkylsulfonyl, сульфонамидо, аминоалкокси, алкиламино, гетероариламино, алкилкарбониламино, алкиламинокарбониламино, ариламинокарбониламино, араилкарбониламино, гетероариалкарбониламино, арилкарбониламино, циклоамидо, циклоалкил, циклоамидо, арилсульфонил и арилсульфонамидо.

[1281] лактамные соединения, описанные в этом приложении, включают в себя: соединения формулы (VIII), как показано ниже: ## STR16## где, [1282] W. sub.1 выбирается из группы, состоящей из --OH, --ИЛИ.SUB.36 групп, --NR. sub.37r. sub.38; [1283] W. sub.Выбрано значение 2 из группы, состоящей из O, S и NR.sub.39 групп; [1284] R. sub.29 и P. sub.30 присоединяются, чтобы сформировать 5-6 членных замещенных или незамещенное кольцо, содержащее все атомы углерода или по меньшей мере один O, N или S atom; [1285] R. sub.35 и P. sub.39 могут быть одинаковыми или разными и являются выбранный из группы, состоящей из H, --OH замещенных и незамещенные алкильные группы, замещенные и незамещенные арильные группы, --C(.dbd.O) H, --C(.dbd.O) - алкильные группы, и --C(.dbd.O) - арильные группы; [1286] R. sub.31, R. sub.32, R. sub.33, и P. sub.34 может быть то же самое или различны и независимо выбираются из группы, состоящей из H, Cl, Br, F, I, -- нет.SUB.2, -- CN, -- OH, -- OR.SUB.40 групп, -- NR. sub.41R. sub.42 группы, --C(.dbd.O) R. sub.43 группы, --SH группы, замещенные и незамещенные амидинильные группы, замещенные и незамещенные гуанидинильные группы, замещенный и незамещенный алкил группы, замещенные и незамещенные арильные группы, замещенные и незамещенные арильные группы незамещенные алкенильные группы, замещенный и незамещенный алкинил группы, замещенные и незамещенные гетероциклические группы, замещенные и незамещенные алкиламиноалкильные группы, замещенные и незамещенные диариламиноалкильные группы, замещенные и незамещенные (алкил) (Арил)аминоалкильные группы, замещенные и незамещенные гетероциклические группы, замещенные и незамещенные аминоалкильные группы, замещенные и незамещенные гетероциклические группы, замещенные и незамещенные дигетероциклические группы, замещенные и незамещенные (алкил)гетероциклические группы, замещенные и незамещенные (Арил)гетероциклические группы, заменили и групп hydroxyalkyl незамещенных, замещенных и незамещенные алкоксиалкильные группы, замещенные и незамещенные арилоксиалкильные группы, а также замещенные и незамещенные гетероциклоксиалкильные группы; [1287] R. sub.36 выбирается из группы состоящей из замещенных и незамещенных алкильных групп, замещенных и незамещенных арильных группы, замещенный и незамещенный гетероциклический группы, замещенные и незамещенные гетероциклические группы, --C(.dbd.O) H, --C(.dbd.O) - алкильные группы, --C(.dbd.O) - арильные группы, --C(.dbd.O) O-алкильные группы, --C(.dbd.O) O-арильные группы, --C(.dbd.O) NH.SUB.2, --C(.dbd.O) NH(алкильные) группы, --C(.dbd.O) группы NH (Арил), --C(.dbd.O) N(алкил).SUB.2 группы, --C(.dbd.O) N(Арил).SUB.2 группы, --C(.dbd.O) N(алкильные) (арильные) группы, --NH.SUB.2, --NH (алкильные) группы, -- Группы NH (Арил), --N(алкил).SUB.2 группы, --N(алкил) (Арил) группы, -- N (Арил).SUB.2 группы, --C(.dbd.O) NH (гетероциклические) группы, --C(.dbd.O) N(гетероциклический).SUB.2 группы, --C(.dbd.O)N(алкильные) (гетероциклические) группы, и --C(.dbd.O) N(Арил) (гетероциклические) группы; [1288] R. sub.Выбрано число 37 из группы, состоящей из H, замещенного и незамещенного алкила группы, замещенные и незамещенные арильные группы, а также замещенные и незамещенные гетероциклические группы; [1289] R. sub.38 выбирается из списка группа, состоящая из H, замещенных и незамещенных алкильных групп, замещенных и незамещенных арильных группы, замещенные и незамещенные гетероциклические группы, -- OH, алкоксильные группы, арилоксильные группы, --NH.SUB.2, замещенные и незамещенные гетероциклические группы, замещенные и незамещенные гетероциклические группы незамещенные аминоалкильные группы, замещенные и незамещенные алкиламиноалкильные группы, замещенный и незамещенный диариламиноалкил группы, замещенные и незамещенные ариламиноалкильные группы, замещенные и незамещенные диариламиноалкильные группы, замещенные и незамещенные (алкил) (Арил)аминоалкильные группы, замещенные и незамещенные алкиламино группы, замещенные и незамещенные ариламиногруппы, замещенные и незамещенные (алкил) (Арил)амино группы, --C(.dbd.O) H, --C(.dbd.O) - алкильные группы, --C(.dbd.O) - арильные группы, --C(.dbd.O) O-алкильные группы, --C(.dbd.O) O-арильные группы, --C(.dbd.O) NH.SUB.2, --C(.dbd.O) NH(алкильные) группы, --C(.dbd.O) группы NH (Арил), --C(.dbd.O) N(алкил).SUB.2 группы, --C(.dbd.O) N(Арил).SUB.2 группы, --C(.dbd.O) N(алкильные) (арильные) группы, --C(.dbd.O) - гетероциклические группы, --C(.dbd.O)-о-гетероциклические группы, --C(.dbd.O) NH (гетероциклические) группы, --C(.dbd.O) - N(гетероциклический).SUB.2 группы, --C(.dbd.O) - N(алкил) (гетероциклические) группы, --C(.dbd.O) - N(Арил) (гетероциклические) группы, замещенные и незамещенные гетероциклические группы, замещенные и незамещенные дигетероциклические группы, замещенные и незамещенные (алкил) (гетероциклический)аминоалкильные группы, замещенные и незамещенные (Арил) (гетероциклический)аминоалкильные группы, замещенные и незамещенные гидроксильные группы, замещенные и незамещенные алкоксиалкильные группы, замещенные и незамещенные арилоксиалкильные группы, а также замещенные и незамещенные гетероциклоксиалкильные группы; [1290] R. sub.41 выбрано из группы, состоящей из H, замещенного и незамещенного алкила группы, замещенные и незамещенные арильные группы, а также замещенные и незамещенные гетероциклические группы; [1291] R. sub.42 выбирается из списка группа, состоящая из H, замещенных и незамещенных алкильных групп, замещенные и незамещенные арильные группы, замещенные и незамещенные гетероциклические группы, --C(.dbd.O) H, --C(.dbd.O) - алкильные группы, --C(.dbd.O) - арильные группы, --C(.dbd.O) NH.SUB.2, --C(.dbd.O) NH (алкил) группы, --C(.dbd.O) группы NH(Арил), --C(.dbd.O) N(алкил).SUB.2 группы, --C(.dbd.O) N(Арил).SUB.2 группы, --C(.dbd.O) N(алкильные) (арильные) группы, --C(.dbd.O) O-алкильные группы, --C(.dbd.O) O-арильные группы, замещенные и незамещенные аминоалкильные группы, замещенные и незамещенные алкиламиноалкильные группы, замещенный и незамещенный диариламиноалкил группы, замещенные и незамещенные ариламиноалкильные группы, замещенные и незамещенные диариламиноалкильные группы, замещенные и незамещенные (алкил) (Арил)аминоалкильные группы, замещенные и незамещенные гетероциклические группы, --C(.dbd.O) - гетероциклические группы, --C(.dbd.O)-о-гетероциклические группы, --C(.dbd.O) NH (гетероциклические) группы, --C(.dbd.O)-N (гетероциклический).SUB.2 группы, --C(.dbd.O)-N(алкильные) (гетероциклические) группы, --C(.dbd.O)-n(Арил) (гетероциклические) группы, замещенные и незамещенные гетероциклические группы, замещенные и незамещенные дигетероциклические группы, замещенные и незамещенные гетероциклические группы, замещенные и незамещенные гидроксильные группы, замещенные и незамещенные алкоксиалкильные группы, замещенные и незамещенные арилоксиалкильные группы, а также замещенные и незамещенные гетероциклоксиалкильные группы; и [1292] R. sub.43 is выбирается из группы, состоящей из H, --NH.SUB.2, --NH (алкильные) группы, -- Группы NH (Арил), --N(алкил).SUB.2 группы, --N (Арил).SUB.2 группы, --N(алкил) (Арил) группы, --NH (гетероциклический) группы, --N(гетероциклический) (алкил) группы, --N(гетероциклический) (Арил) группы, -- N (гетероциклический).SUB.2 группы, замещенный и незамещенный алкил группы, замещенные и незамещенные арильные группы, --OH, замещенные и незамещенные алкоксильные группы, замещенный и незамещенный гетероциклический группы, замещенные и незамещенные арилоксильные группы, гетероциклокси группы, --NHON, --N (алкил)ОН группы, --N (Арил)ОН группы, --N (алкил)о-алкильные группы, --N (Арил)о-алкильные группы, --N (алкил)о-Арил группы, и --N (Арил)О-арильные группы.

[1293] предпочтительно R. sub.29 и P. sub.30 соединитесь вместе, чтобы сформировать а замещенное или незамещенное фенильное кольцо.

[1294] Гидропталамидные соединения, описанные в этом приложении включают соединения формулы (IX), как показано ниже: ## STR17## где, [1295] R. sub.44 выбирается из группы, состоящей из замещенных или незамещенный Арил, гетероарил, араилалкил, гетероариалалкил, расплавленный ариларил, нерафинированный ариларил, нерафинированный гетероариларил, нерафинированный гетероариларил, сплавленный арилгетероарил, и unfused арилгетероарил; [1296] R. sub.45, R. sub.47, R. sub.49, и P. sub.51 могут быть одинаковыми или разными и являются независимо выбранный от группы состоя из H, нитро, галоидо, амина, гидроксид, циано, карбоксигруппы кислота и замещенная или незамещенный Арил, гетероарил, алкокси, алкилкарбонил, алкилкарбониламино, алкиламинокарбонил, аминокарбонил, араилалкокси, гетероариалкокси, алкиламино, араилалкиламино, ариламино, гетероариламино, гетероариламиноалкил, гетероциклический, гетероциклический алкокси, гетероциклический алкил и карбоциклический; и [1297] R. sub.46, R. sub.48, R. sub.50, и P. sub.52 могут быть одинаковыми или разными и являются независимыми выбранный из группы, состоящей из H, галогена и замещенного или незамещенные алкильные группы.

[1298] Бензофеноновые соединения, описанные в этом приложении включают соединения формулы (X), как показано ниже: ## STR18## где, [1299] R.

указано пунктирной линией в приведенном выше примере структура; и, ## STR28## где,

[1344] R. sub.98 выбирается из группы, состоящей из H, замещенных алкил и незамещенный алкил; предпочтительно метил, [1345] R. sub.99 is выбранный из группы, состоящей из H, замещенного алкила, и незамещенный алкил; предпочтительно этил, [1346] R. sub.Выбрано значение 100 из группы, состоящей из замещенного или незамещенного Арила, гетероарил, алкоксиарил, арилалкил и гетероарилалкил.

[1347] Бензольные соединения, описанные в этом приложении включают соединения формулы (XXI), как показано ниже: ## STR29## где, [1348] a выбирается из группы, состоящей из --O--, --S--, --NH--, и --NR.sub.8--; [1349] W выбирается из группы состоит из --CH.SUB.2--, -- O--, -- S--, -- NH--, и -- NR.sub.8--; [1350] R. sub.7 выбирается из группы, состоящей из карбоцикла, незаплавленный карбоциклкарбоцикл, замещенный Арил, незамещенный Арил, замещенный гетероарил, незамещенный гетероарил, замещенный слитый арилгетероарил, незамещенный слитый арилгетероарил, замещенный нерастворенный ариларил и незамещенный нерастворенный ариларил; [1351] R. sub.6 выбирается из группы, состоящей из замещенного или незамещенного Арила, и гетероарил; и, [1352] R. sub.8 независимо замещается или незамещенный алкил.

[1353] Пиразолопиримидиновые соединения, описанные во всем этом применение включает соединения формулы (XXII), как показано ниже: ##STR30## where, [1354] R. sub.101 выбирается из группы состоящий из H, нитро, галоген, амино, гидроксид, циано, карбоксициклический кислота, а также замещенный или незамещенный алкил, Арил, гетероарил, алкокси, алкилкарбонил, алкилкарбониламино, сульфонил, аминосульфонил, алкиламинокарбонил, аминакарбонил, арилалкокси, гетероарилалкокси, алкиламино, арилалкиламино, ариламино, гетероариламино, гетероариламиноалкил, гетероцикл, гетероциклизалкокси, гетероциклизалкильные и карбоциклизалкильные группы; [1355] R. sub.102 выбирается из группы, состоящей из H, нитро, галогена, амино, гидроксид, циано, карбоновая кислота, а также замещенный или незамещенный алкил, Арил, гетероарил, алкокси, алкилкарбонил, алкилкарбониламино, алкиламинокарбонил, аминакарбонил, арилалкокси, гетероарилалкокси, алкиламино, арилалкиламино, ариламино, гетероариламино, гетероариламиноалкил, гетероцикл, гетероциклизалкокси, гетероциклизалкильные и карбоциклизалкильные группы; [1357] R. sub.104 выбрано из группы, состоящей из H и замещенного или незамещенного Арила, гетероарил, арилалкокси, гетероариалкокси, арилалкиламино, ариламино, гетероариламино, гетероариламиноалкил, гетероцикл, гетероциклизалкокси, гетероциклизалкильные, карбоциклизалкильные и карбоциклизалкильные группы; [1358] R. sub.105 выбирается из группы, состоящей из H и замещенных или незамещенный Арил, гетероарил, арилалкокси, гетероариалкокси, арилалкиламино, ариламино, гетероариламино, гетероариламиноалкил, гетероцикл, гетероциклизалкокси, гетероциклизалкильные, гетероциклизалкильные и карбоциклизалкильные группы; [1359] где по крайней мере один из R. sub.104 и R. sub.105 - это не H.

[1360] соединения SMIP, идентифицированные in-vitro (клеточные или неклеточные анализы) или методы in-vivo подробно описаны в методах 1 и 2 ниже.

[1361] фармацевтические композиции, содержащие соединения изобретение может быть в любой форме пригодны для предполагаемого способа осуществления изобретения. администрирование, в том числе, например, решение, приостановление или эмульсия. Жидкие носители обычно используются при приготовлении растворов, суспензии и эмульсии. Жидкие носители, предназначенные для использования в практика настоящего изобретения включают, например, воду, физраствор, фармацевтически приемлемый органический растворитель(ы), фармацевтически приемлемые масла или жиры и тому подобное, а также смеси из двух и более компонентов из этого. Жидкий носитель может содержать другие подходящие фармацевтически препараты приемлемые добавки, такие как солибулизаторы, эмульгаторы, питательные вещества, буферы, консерванты, суспендирующие вещества, загустители, вязкость регуляторы, стабилизаторы и тому подобное. Соответствующие органические растворители включают, например, моногидрические спирты, такие как этанол, и многоатомные спирты, например глицоли. Подходящие масла включают, например, соевое масло, кокосовое масло, оливковое масло, сафлоровое масло, хлопковое масло и тому подобное. Для парентеральной администрации, несущая может также быть маслообразным Эстером такими как этиловый олеат, миристал изопропила, и подобие. Составы самого настоящего изобретение также может быть выполнено в виде микрокапсулы, микрокапсулы, липосомальные инкапсулирует, и тому подобное, а также комбинации любых двух или более из них.

[1362] другие добавки включают иммуностимулирующие агенты, известные в этой области. Иммуностимулирующие олигонуклеотиды и полинуклеотиды описаны в следующих работах: PCT WO 98/55495 и PCT WO 98/16247. Патентная заявка США №. 2002/0164341 описывает адьюванты, включая неэтилированную CpG динуклеотид (CpG ODN) и адьювант нуклеиновой кислоты. патент США В заявке № 2002/0197269 описываются композиции, включающие в себя: антиген, антигенный CpG-ODN и поликатионный полимер. Прочее иммуностимулирующие добавки, описанные в данной статье, могут быть использованы, например: пример, как описано в U. S. Pat. No. 5,026,546; U. S. Pat. Нет. 4,806,352; и США Пат. № 5,026,543.

[1363] может использоваться система доставки с регулируемым высвобождением, например: диффузионно-управляемая матричная система или эродируемая система, как описано например, в: Lee, "Diffusion-Controlled Matrix Systems", PP. 155-198 и Рон и Лангер, "Erodible Systems", PP. 199-224, in " Treatise on Контролируемая Доставка Лекарств", А. Кидониус Ред., Marcel Dekker, Inc., Новый Йорк 1992. Матрица может быть, например, биоразлагаемым материалом, который может самопроизвольно деградировать in situ и in vivo, например, при гидролизе или ферментативное расщепление, например, протеазами. Система доставки может быть:, например, природный или синтетический полимер или сополимер, например: пример в виде гидрогеля. Образцовые полимеры со сколами связи включают полиэферы, полиортоэферы, полиангидриды, полисахариды, Поли (фосфоэферы), полиамиды, полиуретаны, Поли (имидокарбонаты) и Поли(фосфазены).

[1364] соединения изобретения могут вводиться энтерально, перорально, парентерально, сублингвально, с помощью ингаляционного спрея, ректально или местно в препаратах блока дозировки содержа обычное нетоксическое фармацевтически приемлемые носители, адьюванты и транспортные средства по желанию. Например, соответствующие режимы администрации включают устное, subcutaneous, трансдермальный, трансмукозальный, ионтофоретический, внутривенный, внутримышечный, внутривнутрино, интраназально, подкожно, ректально и тому подобное. Актуальный администрирование может также включать использование трансдермального администрирования как трансдермальные заплатки или приборы ионофореза. Термин парентеральный включает подкожные инъекции, внутривенные, внутримышечные, интрастемальные инъекционные или инфузионные методы.

[1365] инъекционные препараты, например стерильный инъекционный водный раствор или маслянистые взвеси могут быть сформулированы согласно известному искусству используя соответствующие диспергирующие или смачивающие агенты и суспендирующие агенты. То стерильный инъекционный препарат может быть также стерильным инъекционным раствором или суспензия в нетоксичном парентерально приемлемом разбавителе или растворителе, например, в виде раствора в 1,3-пропандиоле. Среди приемлемых транспортными средствами и растворителями, которые могут быть использованы, являются вода, раствор Рингера, и изотонический раствор хлорида натрия. В добавлении, стерильные, фиксированные масла обычно используются в качестве растворителя или суспендирующей среды. Для этого цель любое мягкое фиксированное масло может быть использовано включая синтетическое моно-или Диацилглицерин. В добавлении, жирные кислоты как олеиновая кислота находят польза в приготовление инъекционных препаратов.

[1366] суппозитории для ректального введения препарата могут быть: получают путем смешивания препарата с подходящим неирритирующим наполнителем такого типа как какао-масло, так и полиэтиленгликоли, которые являются твердыми при обычных условиях температура но жидкость на ректальной температуре и поэтому расплавит в прямую кишку и выпустить препарат.

[1367] твердые лекарственные формы для перорального введения могут включать капсулы, таблетки, пилулы, порошки и гранулы. В таких твердых лекарственных формах, как активное соединение может быть смешано по меньшей мере с одним инертным разбавителем, таким как сахароза лактоза или крахмал. Такие лекарственные формы также могут содержать, как есть обычная практика, дополнительные вещества, отличные от инертных разбавителей, например, смазывающие агенты как стеарат магния. В случае с капсулами, таблетки, а также таблетки, лекарственные формы также могут содержать буферные агенты. Таблетки и таблетки могут быть дополнительно подготовлены с кишечными покрытиями.

[1368] жидкие лекарственные формы для перорального введения могут включать: фармацевтически приемлемые эмульсии, растворы, суспензии, сиропы, и эликсиры, содержащие инертные разбавители, обычно используемые в этом искусстве, такие как вода. Такие композиции могут также содержать

адьюванты, такие как смачивание агенты, эмульгирующие и суспендирующие агенты, циклодекстрины и подсластители, ароматизаторы и парфюмерные средства.

[1369] что касается способа управления, то следует подчеркнуть, что он представляет собой комбинацию лечебных средств, которая дает начало ее применению синергетический терапевтический эффект независимо от того, первый или второй средство вводят совместно или раздельно. Таким образом, два агента может быть дано совместно в одиночной дозе или в отдельных одних с уважением к пространству и времени.

[1370] эффективные количества соединений изобретения в целом включите любое количество, достаточное для обнаруживаемого лечения вирусных инфекций.

[1371] успешная обработка предмета в соответствии с изобретением может привести к в индукции уменьшения или облегчения симптомов внутри субъект, страдающий медицинским или биологическим расстройством, например например, остановить дальнейшее прогрессирование расстройства, или профилактика о самом беспорядке.

[1372] количество активного ингредиента которое может быть совмещено с несущие материалы для изготовления одной лекарственной формы будут варьироваться в зависимости на хозяина воздействуют и особым режимом администрирования. Оно будет следует понимать, однако, что конкретный уровень дозы для любого конкретного пациент будет зависеть от различных факторов, в том числе от активности специфическое используемое соединение, возраст, масса тела, общее состояние здоровья, пол, диета, время введения, маршрут введения, скорость введения выделение, комбинация препаратов и тяжесть конкретного заболевания проходит курс лечения. Терапевтически эффективное количество для данного ситуация может быть легко определена с помощью рутинных экспериментов и является в пределах навыков и суждений обычного клинициста.

[1373] соединения настоящего изобретения могут также вводиться внутрь форма липосом. Как известно в искусстве, липосомы, как правило, являются производный от фосфолипидов или других липидных веществ. Липосомы являются образовано моно-или многослойными гидратированными жидкими кристаллами, которые являются диспергируют в водной среде. Любые нетоксичные, физиологически приемлемые и метаболизируемый липид, способный формировать липосомы, может быть использован. То присутствующие композиции в форме липосомы могут содержать, помимо а соединение настоящего изобретения, стабилизаторы, консерванты, вспомогательные вещества и тому подобное. Предпочтительными липидами являются фосфолипиды и фосфатидилолины (лецитины), как натуральные, так и синтетические. Методы к форма липосом известна в искусстве. См., например, Прескотт, Изд., Методы В клеточной биологии, том XIV, Academic Press, New York, NW, p. 33 et seq (1976).

[1374] в то время как соединения SMIP изобретения могут быть введены в виде единственный активный фармацевтический агент, их можно также использовать внутри комбинация с одним или несколькими другими агентами, используемыми при лечении Сарсс. Другие репрезентативные агенты полезные в комбинации с смесями изобретение для лечения вирусных инфекций включает, например, интерферон, Рибавирин, ганцикловир и тому подобное.

[1375] когда дополнительные активные агенты использованы в комбинации с соединения настоящего изобретения, а также дополнительные активные агенты могут быть вообще используйте в терапевтических количествах как показано в НАСТОЛЬНАЯ СПРАВКА ДЛЯ ВРАЧЕЙ (PDR) 53.отхлебывать.rd Edition (1999), то есть включенный здесь путем ссылки, или такие терапевтически полезные количества как было бы известно одному из обычных умений в этом искусстве.

[1376] соединения изобретения и другие терапевтически активные вещества могут быть назначены на рекомендованном максимальном клиническом уровне дозировка или на более низких дозах. Уровни дозировки активных соединений в композиции по изобретению могут быть изменены таким образом, чтобы получить желаемое терапевтический ответ в зависимости от способа введения, степени тяжести о заболевании и реакции больного. Комбинация может быть: вводят в виде отдельных композиций или в виде одной лекарственной формы содержит оба агента. При введении в виде комбинации: терапевтические средства могут быть сформулированы в виде отдельных композиций, которые являются данный В то же время или в разное время, или терапевтические агенты могут быть дано как единая композиция.

[1377] соединения настоящего изобретения могут быть легко синтезированы использование описанных здесь методов или других методов, которые хорошо известны в искусстве.

[1378] соединения могут быть использованы в виде солей, полученных из неорганические или органические кислоты. Эти соли включают в себя, но не ограничиваются следующее: ацетат, адипат, альгинат, цитрат, аспарат, бензоат, бензолсульфонат, бисульфат, бутират, камфорат, камфорсульфонат, диглюкоат, циклопентанпропионат, додецилсульфат, этансульфонат, глюкопептаноат, глицерофосфат, гемисульфат, гептаноат, гексаноат, фумарат, гидрохлорид, гидробромид, гидроиодид, 2-гидроксизтаносульфат, лактат, малеат, метансульфонат, никотинат, 2-нафталинсульфонат, оксалат, памоат, пектин, персульфат, 3-фенилпроионат, пикрат, пивалат, пропионат, сукцинат, тартрат, тиоцианат, п-толуолсульфонат и ундеканат. Кроме того, основные азотсодержащие группы могут быть кватернизованы такими агентами, как низшие алкилгалогениды, такие как метил, этил, пропирил и бутилхлорид, бромиды и йодиды; диалкилсульфаты, такие как диметил, диэтил, дибутил, и диамилсульфаты, длинноцепочечные галогениды как децил, лаурил, миристил и стеарилхлориды, бромиды и йодиды, аралкилгалогениды, такие как бензил и фенэтилбромиды, и другие. Вода или маслорастворимый или диспергируемый продукты таким образом получены.

[1379] примеры кислот которые могут быть использованы для того чтобы сформировать фармацевтически приемлемые кислотно-аддитивные соли включают такие неорганические кислоты, как соляная кислота, серная кислота и фосфорная кислота и такие органические вещества кислоты как щавелевая кислота, малеиновая кислота, Янтарная кислота и лимонная кислота. Базовые модели соли добавления можно подготовить in situ во время окончательной изоляции и очистка соединений формулы (I) или отдельно путем реакции карбоновые кислотные фрагменты с подходящим основанием, таким как гидроксид, карбонат или бикарбонат фармацевтически приемлемого катиона металла или с аммиаком или органическим первичным, вторичным или третичным Амином. Фармацевтически приемлемые соли включают, но не ограничиваются катионами основанный на металлах алкалия и щелочной земли, как натрий, литий, соли калия, кальция, магния, алюминия и тому подобное, а также нетоксичные катионы аммония, четвертичного аммония и Амина, в том числе, но не ограничивается аммонием, тетраметиламмонием, тетраэтиламмонием, метиламин, диметиламин, триметиламин, триэтиламин, этиламин, и тому подобное. Другие репрезентативные органические Амины полезные для образование базовых аддитивных солей включают диэтиламин, этилендиамин, этаноламин, диэтанолламин, Пиперазин и тому подобное.

[1380] различные соединения и способы их получения раскрыты в работе: публикация по международной патентной заявке № WO02 / 18327 (бензамид и соединения на основе пиридиламида); WO0222598, и WO02 / 18383 (на основе ABIQ соединения); и WO 02/81443 (соединения на основе пталамида), которые были найдено в контексте этого изобретения, чтобы быть полезным для иммунной системы потенцирование. Полное раскрытие этих американских и международных данных публикации включены здесь по этой ссылке. Другие соединения или промежуточные продукты, представляющие интерес для настоящего изобретения, были приобретены у коммерчески доступные источники используя следующий метод: химикат структура интереса была внесена в базу данных ACD-SC (от MDL информационные сети). Осуществляется поиск следующих предприятий/учреждений, среди прочего, извлекли поставщика идентифицированного соединения и закупки информация: ASDI, ASINEX, BIONET, CHEMBRIDGE, CHEMDIV, CHEMEX, CHEMSTAR, COMGENEX, CSC, INTERBIOSCREEN, LABOTEST, MAYBRIDGE, MICROSOURCE / GENESIS, OLIVIA, ORION, PEAKDALE, RYAN SCIENTIFIC, SPECS, TIMTEC, U OF FLORIDA, и Зелинский тоже.

Соединения Бензазола

Схема 1

[1381] соединения изобретения, содержащие бензимидазольное ядро, могут быть: подготовлено с использованием ряда методов, знакомых одному из навыков в этом искусстве. В одном методе, подходяще функционализированные диамины могут быть соединены с различные тиоизоцианаты для образования промежуточных тиоуретанов. Циклизация для образования бензимидазола мойеты могут производиться при известных условиях например, с

обработкой карбодиимидами или алкилгалогенидами. В качестве альтернативы: диамины могут быть прореагированы последовательно с карбонилдимидазолом и фосфорилхлорид с последующим соединением с соответствующим Амином. ##STR31##

[1382] соединения, содержащие оксазольную структуру, также могут быть приготовлено по вышеуказанным способам или согласно другим известным общей процедура. Naviv et. Аль. (J. Med. Хим.. 1988, 31, 1719) описывается способ сборки оксазольных стержней, в котором гидроксид анилин обрабатывают этиловым ксантогенатом калия. Полученный сульфурил затем бензоксазол может быть хлорирован и соединен с Амином. ##STR32##

[1383] соединения, содержащие ядро бензотиазола, также могут быть получены по известным методикам. Возможно взаимодействие Орто-галотиозицианата с помощью Амина образуется тиомочевина. Уменьшение с NaN после этого позволяет образование тиазольного кольца. ##STR33##

[1384] Бензотиазолы вообще могут быть заменены в соответствии с настоящим изобретение, например, через следующий синтетический путь: ##STR34##

Синтез из 4-[(2-[(4-хлор-3-(трифторметил)фенил)амино]-1Н-бензимидазол-6-Ил)ОКС-Ил-N-метилпиридин-2-карбоксамид

[1385] соединение 4-[(2-[(4-хлор-3-(трифторметил)фенил)амино]-1Н-бензимидазол-6-Ил)ОКС-у]-N-метилпиридин-2-карбоксамид (159322) был синтезирован следующим образом: ##STR35##

[1386] Шаг 1. Синтез из 4-[(4-амино-3-нитрофенил)Окси]-N-метилпиридин-2-карбоксамид: смесь содержащий 4-амино-3-нитрофенол (1 экв) и калий бис (триметилсилил) Амид (2 ЭК) перемешивали в диметилформамиде в течение 2 ч часы при комнатной температуре. К этой смеси и был добавлен (4-хлор(2-пиридил) - N-метилкарбоксамид (1 экв) и карбонат калия (1.2 экв) и пошевелил на 90.степень. С. На 3 дня. Реакционная смесь была затем концентрируют и разделяют между этилацетатом и водой. То органический слой был отделен и помыть с тузлуком, высушен, фильтрован, и сконцентрировано в вакууме для того чтобы дать коричневое твердое тело. Очистка на силикагеле (2% триэтиламин / 50% этилацетат в гексане) дал 4 - [(4-амино-3-нитрофенил)Окси] - N-метилпиридин-2-карбоксамид в качестве оранжевое твердое вещество. Продукт дал удовлетворительное ЯМР. ВЭЖХ, 3,39 мин; МС: МГН.отхлебывать. +=289.

[1387] Шаг 2. Синтез из 4-[(3,4-диаминофенил)Окси]-N-метилпиридин-2-карбоксамид: смесь содержащий [4-(3-амино-4-нитрофенокси) (2-пиридил)] - N- в метаноле с каталитическое количество 10% Pd / С было гидрировано до исчезновения желтый цвет для того чтобы произвести продукт Амин. ВЭЖХ, 2,5 мин; МС: МГН.отхлебывать. +=259.

[1388] Шаг 3. Синтез из 4-[(2-[(4-хлор-3-(трифторметил)фенил)амино]-1Н-бензимидазол-6-Ил)ОКС-у]-N-метилпиридин-2-карбоксамид: смесь, содержащая 4 - [(3,4-диаминофенил)Окси] - N-метилпиридин-2-карбоксамид (1 экв) и 4-хлор-3-(трифторметил)бензоизоцианат (1 экв) в тетрагидрофуран перемешивали при комнатной температуре в течение 16 часов для получения соответствующая тиомочевина. К получившейся смеси был добавлен 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид гидрохлорид (2 Эк) и смесь перемешивали еще 10 часов. Эта смесь была ... концентрированный и разделенный между этилацетатом и водой. Органика слой промывают рассолом и сушат. Очистка на ВЭЖХ дала 4-[(2-[(4-хлор-3-(трифторметил)фенил)амино]-1Н-бензимидазол-6-Ил)ОКС-у]-N-метилпиридин-2-карбоксамид. MS: МН.отхлебывать. +=462

Синтез из 4-[(2-[(4-бромфенил)амино]-1-метил-1Н-бензимидазол-5-Ил)Окси]-N-метилп-ириндин-2-карбоксамид

[1389] соединение 4-[(2-[(4-бромфенил)амино]-1-метил-1Н-бензимидазол-5-Ил)Окси]-N-метилп-ириндин-2-карбоксамид (161651) был синтезирован следующим образом: ##STR36##

[1390] Шаг 1. Синтез из 4 - {[3-амино-4-(метиламино)фенил]Окси} - N-метилпиридин-2-карбоксамид: а раствор 4 - [(4-амино-3-нитрофенил)Окси] - N-метилпиридин-2-карбоксамид (1 экв) в метилхлориде обрабатывали трифторуксусным ангидридом (1 экв) и перемешивают в течение 10 минут при 0.степень. С. смесь была потушен вместе с satd. Нахко.SUB.3 решение. Органический слой был отделен и промывают водой, рассолом, сушат и выпаривают. MS: МН.отхлебывать. +=385.2

[1391] к раствору трифторацетамида (1 экв) в смеси был добавлен раствор толуола, ацетонитрила и гидроксида натрия (50%) бензилтриметиламмоний хлорид (1 экв) и диметилсульфат (1,2 экв). Двухфазную смесь перемешивали в течение ночи при комнатной температуре и выпаренный. Смесь брали в этилацетате, промывали водой, рассол, высушенный и выпаренный. Неочищенный продукт очищали колонной хроматография элюирование с 1: 1 гексанов и этилацетата с последующим 2% триэтиламин в гексанах 1:1 и этилацетате следовать 2% триэтиламин в 1:1 гексанах и этилацетате, чтобы позволить себе N-метил-4 - [(4-(метиламино)-3-нитрофенил)Окси]пиридин-2-карбоксамид в качестве красновато-оранжевое твердое вещество. MS: МН.отхлебывать. +=303.1.

[1392] раствор нитрометиланилина в метаноле обрабатывали 5% - ным спиртом.% палладий на углероде и перемешивают в атмосфере водорода в течение 15 мин. (до исчезновения желтой окраски) при комнатной температуре. То смесь фильтровали, а фильтрат концентрировали до получения 0,36 г из диамина 4 - {[3-амино-4-(метиламино)фенил]Окси}-N-метилпиридин-2-карбоксамид. MS: МН.отхлебывать. +=273.3.

[1393] Шаг 2. Синтез из 4-[(2-[(4-бромфенил)амино]-1-метил-1Н-бензимидазол-5-Ил)Окси]-N-метилп-ириндин-2-карбоксамид: раствор диамина 4 - {[3-амино-4-(метиламино)фенил]Окси} - N-метилпиридин-2-карбоксамид (1 экв) в метаноле обрабатывали 4-бромфенилизотиоцианатом (1 экв) и размешали на 60.степень. С.-65.степень. С. На 2 часа. Реакционная смесь был охлажен вниз к комнатной температуре и был добавлен метил иодид (1 ЭК) и перемешали за ночь в 60.степень. С. реакция была охлажена к комнате температура, испаренная, принятая вверх в этилацетате, и помытая с водой и рассол, высушенный, и испаренный под уменьшенным давлением. Колонка хроматография с использованием градиентной растворяющей системы гексанов и этила ацетат и или хлорид метилена 1:1 и ацетон или метанол 5% внутри хлорид метилена дал продукт как половинный белый порошок. MS: МГН.отхлебывать. +=452.3

Аминобензимидазолхинолиноны

[1394] соединения структуры I могут быть синтезированы из простого начала молекулы, как показано на схемах 1-4 и проиллюстрировано в примерах. Как показанные на схеме 1, соединения структуры I могут быть в общем случае получены применение ароматических соединений, замещенных аминами и карбоновой кислотой Группы. ##STR37##

[1395] как показано на схеме 2, замещенное ароматическое соединение, такое как а замещенная или незамещенная 2-аминобензойная кислота может вступать в реакцию с ацилгалогенид, такой как метил 2 - (хлоркарбонил)ацетат, для получения амида это будет реагировать с замещенным или незамещенным 1,2-диаминобензолом. Полученный продукт представляет собой 4-гидроксизамещенное соединение структуры I. Один специалист в этой области признает, что процедура, изложенная в Схема 1 может быть модифицирована для получения различных соединений.

[1396] способ получения 4-аминозамещенных соединений структуры I показано на схеме 3. Как показано на схеме 3, ароматические соединения замещенные Амином и нитрилом 20 группы могут быть использованы для синтеза 4-аминозамещенные соединения структуры I. соединение типа этила 2-цианоацетат может быть прореагирован с этанолом для того чтобы произвести этил 3-этокси-3-иминопропаноат гидрохлорид. Последующая реакция с а замещенный или незамещенный 1,2-фенилендиамин обеспечивает замещение или незамещенный этил 2-бензимидазол-2-илацетат. Реакция замещенного вещества или незамещенный этил 2-бензимидазол-2-илацетат с ароматическим соединением, имеющее аминную и нитрильную группы, такие как замещенные или незамещенный 2-аминобензонитрил С таким основанием, как литий бис (триметилсилил)Амид или кислота Льюиса, такие как тетрагидрид олова обеспечивает замещенное или незамещенное 4-аминозамещенное соединение структура I. ##STR38##

[1397] Схема 4 иллюстрирует общий синтетический маршрут, который позволяет синтез 4-диалкиламино и 4-алкиламиносоединений структуры I. Ап проверка схемы 3 показывает, что 4 - гидроксизамещенные соединения структура I может быть преобразована в производное 4-хлора реакцией с фосфористым оксихлоридом или хлористым тионилом. Производное 4-хлора может после этого быть прореагировано с алкиламином или диалкиламином

для производства соответствующее производное 4-алкиламино или 4-диалкиламино. Депротекция дает конечные 4-алкиламино или 4-диалкиламино соединения структуры I. Другие группы которые могут быть прореагированы с производным 4-хлора в этом способ включает, но не ограничивается, ROH, RSH и CuCN. ##STR39##

[1398] как показано на схеме 5, синтез соединений структуры I имеющие в своем составе H, алкильную группу, арильную группу или гетероциклическую группу 4-позиция может быть выполнена с использованием замещенного или незамещенного 2-бензимидазол-2-илацетат получают так, как показано на схемах 3 и 4. ## STR40# # Тиосемикарбазоны

[1399] общий способ получения тиосемикарбазонов ##STR41##

[1400] раствор альдегида (1,0 экв.) и тиосемикарбазид (1.05 эквив.) в уксусной кислоте перемешивали всю ночь. Избыток уксусной кислоты был извлеченный для того чтобы дать выпарку, которая была помыта с этанолом, или очищенный мимо препарат-ВЭЖХ для получения тиосемикарбазона.

Схема 7

[1401] раствор альдегида (1,0 экв.), тиосемикарбазид (1.05 эквив.) и уксусной кислоты (0,1 экв.) в метаноле перемешивали всю ночь. Метанол был удален, чтобы дать остаток, который был разработан как в схеме 6.

Схема 8

[1402] к решению задачи: {[(1E)-1-Аза-2-(4-фтор-3-нитрофенил) винил]амино } - аминотетан-1-Тион- е в этанол был добавлен ариламин (2.1 экв.). Раствор был перемешан при комнатной температуре до начала фторирования исчезает. Решение был очищен к продукту. ##STR42##

Схема 9

[1403] смесь 4-(диэтиламино)-2-гидроксibenзальдегида (1 экв.), бензиловый бромид (1,2 экв.) и карбонат калия порошка в этаноле перемешивали при комнатной температуре в течение 2 суток. Этанол был извлечен, и остаток растворяли в этилацетате и воде. Органический слой был промывают водным раствором NaHCO.SUB.3 и рассол, высушенный над Na.SUB.2co.SUB.4., и сосредоточился. Остаток очищали на силикагеле элюированием с помощью этилацетат / гексан для получения 4-(диэтиламино)-2-бензоксилбензальдегида.

[1404] альдегиды были преобразованы к тиосемикарбазонам согласно Схема 7. ##STR43##

Схема 10

[1405] раствор 3,4-дифторбензолкарбонитрила (1 экв.), амин (1.5 экв.) и DIEA (2 экв.) в НМП нагревали в микроволновке Смита (Личная химия) в течение 30 минут. Реакционную смесь очищали на силикагель дает 4-замещенный 3-фторбензенкарбонитрил.

[1406] к раствору нитрила в толуоле при -78.степень. С. было добавлено: ДИБАЛ-Н (1 м в толуоле, 1,5 экв.). Реакционную смесь подогрели до rt, и пошевеленный на 16 h, и погашенный с метанолом / этиловым уксусом / тузлуком (1:1:4). После перемешивания при РТ в течение 30 мин раствор экстрагировали с этилацетатом (3.раз.). Объединенные органические слои были промыты с водным раствором NaHCO.SUB.3, рассол и концентрированный. Этот альдегид был ... очищенный на силикагеле или непосредственно превращенный в тиосемикарбазоны (Схема 7).

Схема 11

[1407] раствор 2,4,5-трифторбензолкарбонитрила (1 экв.) и 4-арилпиперазин (1,2 экв.) и DIEA (1.2 экв.) в ТГФ нагревали при 80.степень. С. На 2 часа. Смесь была очищена на силикагеле для того чтобы дать 4-замещенный 2,5-дифторбензолкарбонитрил.

Схема 12

[1408] к спирту (1,0 экв) был добавлен Т-бутоксид калия в ТГФ (1 М, 1.1 equiv). Через 5 минут раствор был добавлен к раствору следующего состава: 4-п-замещенный-2,5-дифторбензолкарбонитрил (1 экв.) в THF. То реакционную смесь перемешивали при РТ в течение ночи и закаливали водой хлористый аммоний. Водный слой экстрагировали этилацетатом (3.раз.). Объединенные органические слои промывали рассолом, и концентрированный, чтобы дать остаток, который был очищен, чтобы дать 4-п-замещенный-2-О-замещенный-5-фторбензолкарбонитрил.

[1409] 4-п-замещенный-2-О-замещенный-5-фторбензолкарбонитрил был уменьшенный с ДИБАЛ-Х для того чтобы дать а 4-N-замещенный-2-О-замещенный-5-фторбензальдегид согласно процедура в схеме 10.

[1410] альдегид был преобразован в соответствующий тиосемикарбазон используя схему 7.

Схема 13

[1411] раствор 4-п-замещенного-2,5-дифторбензолкарбонитрила (1 эквив.), Амин (1,5 экв.) и DIEA (2 экв.) в НМП был нагрет в а Микроволновая печь Smith (личная химия) в течение 30 минут. Реакционная смесь был очищен на силикагеле, чтобы дать 4-п-замещенный-2-п-замещенный-5-фторбензолкарбонитрил.

[1412] 4-п-замещенный-2-п-замещенный-5-фторбензолкарбонитрил был восстановлено с помощью ДИБАЛ-Н в соответствии с процедурой, описанной в схеме 10 - дайте 4-п-замещенный-2-п-замещенный-5-фторбензальдегид.

Способ получения аминогруппы {3 - [5-(3-хлорфенил)(2-фурил)] (2-пиразолинил)}метан-1-Тион

[1413] # # STR44##

[1414] к раствору 5-(3-хлорфенил)фуран-2-карбальдегида (1,0 эквив.) в ТГФ при 0.степень. С. был добавлен MeMgBr в эфир (3.0 equiv.) и перемешивают в течение 45 мин. Реакция была погашена водой, разбавленной с помощью эфир и фильтруется через селитру. Органический слой был отделен и промывают рассолом, сушат над Mgco.SUB.4, и сконцентрированный для того чтобы дать 1 - [5-(3-хлорфенил)-2-фурил]Этан-1-ол.

[1415] к раствору вторичного спирта (1,0 экв.) в ч.SUB.2Cl.SUB.2 был добавлен MnO.SUB.2 (10 экв.). Реакция была взбуражена в односторонне, фильтрованный через селит, и сконцентрированный для того чтобы дать 1 - [5-(3-хлорфенил)-2-фурил]Этан-1-он.

[1416] к смеси кетона (1,0 экв.), параформальдегид (2,0 эквив.), и хлоридат диметиламина (2,0 экв) и молекулярные сетки в этанол добавляют концентрированную соляную кислоту (кат.). Реакция разливался за ночь под азотом и концентрировался. Несколько капель HCl был добавлен, и смесь была обработана с DCM и водой. То органический слой был отброшен. Водный слой был отрегулирован к основному и извлекается с помощью DCM (3.раз.). Органический слой промывали рассолом, сушат над Mgco.SUB.4, и сконцентрированный для того чтобы произвести 3-(диметиламино)-1-[5-(3-хлорфенил) (2-фурил)] пропан-1-он.

[1417] Тиосемикарбазид (1,0 экв.) был растворен в MeOH при нагревании под азотом. Водный гидроксид натрия (6 м, 9,0 экв.) был добавлен в реакция. А метанольный раствор из 3-(диметиламино)-1-[5-(3-хлорфенил) (2-фурил)]пропан-1-он (1,0 экв) затем капельно добавляют в реакционную смесь.

Растворитель был удален а остаток растворяли в ДКМ и промывали водой, рассолом, сушили над Mgco.SUB.4, и сосредоточился. Окончательная смесь была очищена мимо препарат-ВЭЖХ для получения Амина {3 - [5 - (3-хлорфенил) (2-фурил)] (2-пирозолинил)}метан-1-Тион; ЖК / МС m / z 306,2 (МН+); Rt=3,06 минуты. ##STR45##

[1418]к раствору 4-пиридилметиламина (1,0 экв.) и триэтиламин (2,0 экв.) в КХЛ.SUB.3 был добавлен CS.SUB.2 (1,0 экв.) и перемешивали всю ночь. Реакция была охлаждена до 0.степень. С. и этил хлороформат (1,0 экв.) был добавлен по капле. Реакция была взбаломучена в течение 15 мин при 0.степень. С. И после этого пошевеленный на комнатной температуре на 2 hrs с последующим добавлением (трет-бутил)оксикарбогидразида (1,2 экв.). После перемешивание в течение часа добавления смесь промывают водным раствором лимонной кислоты (5%), насыщенная NaHCO.SUB.3, рассол, высушенный над Mgco.SUB.4, и концентрированный. Был очищен заданный тиосемикарбазид защищенный Бос с помощью колоночной хроматографии.

[1419]к раствору Бос-защищенного тиосемикарбазид (1,0 экв.) растворенный в DCM добавляли HCl в диоксане (2М, 8.3 экв.) и перемешал на 15 мин. MeOH после этого добавлено для того чтобы растворить преципитат, следовать добавление фурфуурола и небольшого количества уксусной кислоты (0,5 мл). То смесь перемешивают в течение ночи и растворители удаляют, чтобы дать а остаток очищают препаративно-ВЭЖХ с получением тиосемикарбазона.

Синтез 4 - [4-(4-метилпиперазин-1-Ил) феноксиметил]бензальдегида

[1420] # # STR46##

[1421] к раствору 4-Пиперазин-1-Ил фенола (1 эквивалент) в СНCl.SUB.3, охлажденный до 0.степень. С., был добавлен Ди-Т-бутилдикарбонат (1 эквивалент) в КХЛ.SUB.3 капель-мудрый. Раствор был перемешан при 0.степень. С. На 1 час перед извлекать от холодной ванны и шевелить при температуре окружающей среды в течение 18 часов. Органический раствор был промыт водный NaHCO.SUB.3 и рассол высушенный над Mgco.SUB.4 и сконцентрировал свое сырой материал использовался без очистки.

[1422] раствор полученного 4-(1-бок-Пиперазин-4-ил)фенола (1 эквивалент) в сухой ч.SUB.3CN было медленно добавлено падени-велемудро к slurry NaN (1 эквивалент) в сухой ч.SUB.3CN на комнатной температуре под N. sub.2. Суспензию перемешивали при комнатной температуре в течение 2 часов до образования твердых частиц были отфильтрованы и промыты с Et.SUB.2O. # # STR47##

[1423] натрий 4-(1-бок-Пиперазин-4-ил)феноксид (1 эквивалент) и метил 4-бромметилбензоат (1 эквивалент) были объединены в сухой ацетон и нагретый до температуры 60 градусов с обратным холодильником.степень. С. В течение 18 часов. Суспензию фильтровали и фильтрат был после этого сконцентрирован для того чтобы обеспечить незрелый метил 4-[4-(1-бок-Пиперазин-4-ил)феноксиметил]бензоат, который был использован без очистка. ##STR48##

[1424] к суспензии Лиала.SUB.4 (4 эквивалента) в сухом THF, охлажденном к 0.степень. С. под N. sub.2, Медленно был добавлен падени-велемудрый разрешение метил 4 - [4 - (1-бок-Пиперазин-4-ил)феноксиметил]бензоат (1 эквивалент) в сухом THF. Как только добавление было закончено, slurry был нагрет к рефлюкс на 80.степень. С. На 1 час. Суспензию впоследствии охлаждали до 0.степень. С. и обработанный с водой, aq 10%. NaOH и с водой снова. Полученные твердые вещества фильтровали, а фильтрат разбавляли водой. хлороформ, промытый рассолом, сушат над Mgco.SUB.4 и концентрированный, получение сырого 4 - [4 - (4-метилпиперазин-1-Ил)феноксиметил]бензила спирт, который использовался без очистки. ##STR49##

[1425] к раствору ДМСО (2,6 эквивалента) в сухом DCM, охлажденном до -78.степень. С. под N. sub.2 был добавлен хлорид оксалила (1.1 эквивалента) в DCM drop-wise. Раствор перемешивали при температуре -78.степень. С. Для 5 за несколько минут до решения вопроса 4 - [4-(4-метилпиперазин-1-Ил)феноксиметил]бензиловый спирт (1 эквивалент) в DCM добавляли по каплям и давали перемешать при -78.степень. С. Для еще 30 минут. Триэтиламин (2,5 эквивалента) медленно капал внутрь прежде чем позволить раствору достигнуть температуры окружающей среды. Решение промывали водным раствором NaHCO.SUB.3 и рассол, высушенный над Mgco.SUB.4 и сконцентрированный для того чтобы обеспечить незрелое 4 - [4-(4-метилпиперазин-1-Ил) феноксиметил]бензальдегид, который был преобразуется в тиосемикарбазоны по схеме 7. Пирролы ##STR50## # # # STR51##

Способ получения трет-бутил (2е) - 3-(2,4-дихлорфенил)проп-2-еноата (2)

[1426] чистый DIC (1.4 eq) был добавлен к хорошо перемешиваемому раствору циннамат (1 экв), Т-бутиловый спирт (4 экв), DMAP (1,4 экв) и ГЛ.SUB.2Cl.SUB.2 под аргоном на rt. (Примечание -- циннамат должен быть полностью в растворе, который может потребовать мягкого прогрева. Позвольте the раствор остудить до комнатной температуры перед добавлением ДВС. Чтобы избежать Ан экзотерм на более больших масштабах, может быть благоприятно разбавить DIC с ГЛ.SUB.2Cl.SUB.2 перед добавлением и имейте ванну льда готовую.) После при перемешивании в течение 8 часов реакция развивается в виде белого осадка. То реакцию можно контролировать с помощью ТСХ элюирования с 25% EtOAc / гексан (R. sub.ф продукта было 0,9). Вся реакция была загружена в сепаратор воронка (мойка с ч.SUB.2Cl.SUB.2). Органическая смесь была промыта с цитратом, сб. aq. Нахко.SUB.3, вода и рассол. Органический слой был высушен (на.SUB.2co.SUB.4), фильтрованный, и сконцентрированный к засохлости к дайте сырой продукт в виде масла. Сырая нефть была смешана с гексаном и перемешивают в течение 30 мин. Осадок, который образуется фильтровали над селитом и фильтрат был выпарен. Смесь гексана была загружена на а фильтрующая заглушка из диоксида кремния и элюированная этанолом/гексаном (97: 2 в/в). Первый элюированные УФ-активные фракции собираются и испаряются для получения >99% чисто 2 (выходы 75-80%). ##STR52##

Способ получения трет-бутил 4-(2,4-дихлорфенил)пиррол-3-карбоксилата (3)

[1427] сухой эфир был добавлен к NaN (1.5 eq как рассеивание масла) под аргон. После сцеживания эфира с помощью шприца, NaN был приостановлен опять со свежим эфиром под аргоном. Решение задачи ТОСМИКА (1.1 eq) и 2 (1 eq) растворенный в смеси эфира и DMSO был добавлен по каплям к перемешивают суспензию NaN при 0.степень. С. Над 20-30 min. Дополнение был слабо экзотермичен и выделял газ. После добавления происходит реакция было позволено согреть к окружающему rt. прогресс реакции был после того как я следовать TLC (25% EtOAc / Hexane, UV активный продукт были на R. sub.f=0.4) и LCMS до тех пор, пока не будет сделано (.о нас.2-3 часа). По завершении проекта, реакция была тщательно подавлена с помощью sat. aq. NH.SUB.4Cl (добавляется медленно к избегайте сильной эволюции газа и экзотермы) и разбавляется эфиром. То слои были отделены и органическая фаза была промыта sat. aq. Нахко.SUB.3, вода и рассол. Незрелое темное твердое тело может быть очищено мимо перекристаллизация. Наилучшие результаты были достигнуты либо за счет рекристаллизация непосредственно из смеси горячего EtOAc/гексана (1:3 В/в) или путем растворять незрелый продукт в минимальном горячем EtOAc следовать мимо добавление гексана (.о нас.2 тома гексана в зависимости от объема EtOAc). Горячие растворы оставляли остывать до комнатной температуры и возраст за ночь. Кристаллы были сперва фильтрованы и после этого помыты с гексан дает 99% чистого продукта с выходом 60-70%. ##STR53##

Способ получения трет-бутила 4-(2,4-дихлорфенил)-1-[3-(1,3-диоксобензо [с]азолин-2-Ил) пропил]пиррол-- 3-карбоксилат (4)

[1428] твердый NaN (1.5 eq как рассеивание масла) был добавлен в малом порции к раствору пиррола 3 (1 экв) и 3-бромпропилфталимида (1.2 eq) растворенный в DMF пошевелил на комнатной температуре и потопил с аргон. Примечание-некоторые газы эволюционируют, но температура, похоже, не повышается выше 40-50.степень. С. реакция была пошевелена на 1.5 h на комнате температура под аргоном. Реакция последовала за TLC (ГЛ.SUB.2Cl.SUB.2 / ацетонитрил (95:5 В/в), ультрафиолетовый активный продукт был на R. sub.f=0,5) и LCMS. По завершении, реакция была погашена с помощью сидел. aq. NH.SUB.4Cl (добавьте медленно для того чтобы во избежание сильное развитие газа и экзотермический). Сб. aq. Нахко.SUB.3 был затем добавлен, чтобы избежать эмульсии, и основную органическую смесь экстрагировали эфиром. Комбинированный эфир слои были промыты с помощью sat. aq. Нахко.SUB.3, вода, высушенный рассол, Na.SUB.2co.SUB.4, фильтрованный, и сконцентрированный к засохлости для того чтобы дать незрелое продукт. Неочищенный продукт был очищен путем элюирования через кремнезем с Этоак/гексан (1:4 в/в). Очищенный продукт содержал некоторый остаток 3-бромпропилфталимид, который не мешал последующему синтезическим ступени. Материал был принят дальше и использован без более дальнешего очистка. Предположим, количественный выход. ##STR54##

Способ получения трет-бутила 1-(3-аминопропил) - 4 - (2,4-дихлорфенил)пиррол-3-карбоксилат (5)

[1429] Пталимидопиррол 4 (1 экв) был растворен в этаноле и гидразин (3 экв) при комнатной температуре под азотом. При нагревании до рефлюкс, реакция произвел белый преципитат. Перемешать с обратным холодильником до тех пор, пока полный (.о нас.2 h) по TLC (ч.SUB.2Cl.SUB.2 / ацетонитрил (95: 5 в/в), УФ-активный продукт был в R. sub.f=0,2) и LCMS. При достижении завершения, реакция было позволено охладить к комнатной температуре и осадок отфильтровывали в вакууме с использованием среды для тонкой спекания стекла Фильтр. Фильтрат концентрировался под пониженным давлением до клейкого состояния твердый. Сырой материал был взят в этаноле / EtOAc (1:1 v/v), перемешивают и осадок отфильтровывают таким же способом, как и в случае с осадками, полученными в результате смешивания. до. Фильтрат концентрировался под пониженным давлением и чем сушат в вакууме в течение 10-15 мин. Этот процесс добавления этанола / EtOAc, фильтровать и концентрировать были сделаны еще раз или по мере необходимости для того чтобы извлечь большая часть белого осадка и остаточного гидразина. Товар затем была высушена в вакууме на ночь. Материал был использован без дальнейшего использования очистка. Как только высушенный, реакция дала продукт как стекло (.о нас.Выход 87% над 2 шагами). ##STR55##

Способ получения трет-бутила 1 - {3 - [(6-амино-5-нитро(2-пиридил)) амино] пропил} - 4-(2,4-дихлорфенил)Пирр- роль-3-карбоксилат (7)

[1430] к предварительно смешанным сухим реагентам, пирролу 5 (1 экв) и порошку 6-хлор-3-нитро-2-пиридиламин (6) (1.1 eq), был добавлен DMA следовать по основанию Гунига (2 экв) последовательно с перемешиванием при rt. реакция была затем нагрели до 80.степень. С. На ночь. Реакция последовала за TLC (Этоак/гексан (1:1 в/в), ультрафиолетовый активный желтый продукт были на R. sub.f=0,25), ВЭЖХ и ЖК. По завершении, как это было определено ВЭЖХ, реакцию дали остыть до 70 градусов.степень. С. Этилендиамин (безводный) был затем добавлен к реакции, чтобы уничтожить все оставшиеся непрореагировавший хлорпиридин 6. После 15 мин перемешивания при температуре 70.степень. С., the реакцию охлаждали и гасили с добавлением СБ. аq. Нахко.SUB.3. Водная смесь была извлечена с EtOAc, и комбинированные органические слои промывали sat. аq. Нахко.SUB.3, вода, рассол, высушенный, фильтрованный, и сконцентрированный к засохлости для того чтобы дать незрелое изделие в виде коричнево-желтого твердого вещества. Сырой продукт был очищен вспышкой хроматография элюированная с EtOAc / гексаном (4:6 v/v). Очищенный СНАР аддукт 7 был выделен с выходом 58% в виде желтого твердого вещества. ##STR56##

Подготовка к проведению 1 - {3 - [(6-амино-5-нитро(2-пиридил)) амино] пропил} - 4-(2,4-дихлорфенил)Пирр- роль-3-карбоновая кислота (8)

[1431] во флаконе к перемешиваемой смеси добавляли TFA (каталитическое количество трет-бутилового эфира пиррола 7 (1 экв), воды (0,1%) и ч.SUB.2Cl.SUB.2 на rt. The пробирка пошевелила на комнатной температуре до тех пор пока сделанный (.о нас.12 ч. The затем реакцию концентрировали под пониженным давлением при комнатной температуре и сушат в вакууме. Сырой остаток был снова растворен в воде. ГЛ.SUB.2Cl.SUB.2 и сконцентрированный под уменьшенным давлением на rt. The материал был использован в последней стадии соединения без дальнейшей очистки как соль TFA. ##STR57##

Подготовка к проведению N-((1S)-2-гидрокси-изопропил) (1-{3-1(6-амино-5-нитро (2-пиридил))амино]проп- Ил}-4 - (2,4-дихлорфенил)пиррол-3-Ил) карбоксамид (9)

[1432] (2S)-(+)-2-Аминопропан-1-ол (1,5 экв.) добавляют к перемешиваемому раствору смесь кислоты (8) (1 экв), ГБТУ (1,5 экв), основания Гунига (2 экв) и ДМФ (предварительно смешанный последовательно в этом порядке во флаконе) при комнатной температуре под аргон. Реакцию перемешивали в течение 3-4 ч до полного завершения, как показано на примере LCMS и ВЭЖХ. Реакционную смесь затем разбавляли EtOAc, промытые с помощью NaHCO.SUB.3, и сконцентрированный для того чтобы позволять порошок в 70% уступать.

[1433] номенклатура для примера соединений была предоставлена с использованием названия ACD версия 5.07 программное обеспечение (ноябрь. 14, 2001) доступный от предварительной химии Development, Inc. Некоторые из соединений и исходных материалов были названы используя стандартную номенклатуру IUPAC.

[1434] соединения таблицы 34 были синтезированы следующим образом: методология описана выше в примерах и схемах, а также экранирована следующие методы 1 и 2 ниже. Предшественники легко узнаваемы одним квалифицированным специалистом в этой области и доступны на рынке от Олдрича (Milwaukee, Wis.) или Acros Organics (Питтсбург, Пенсильвания.), среди прочего.

Методы скрининга для соединений SMIP / SMIS

Метод 1

[1435] иммуно-потенциаторы кандидатов малые молекулы можно определить внутри витро. Соединения экранируются in vitro для их способности активировать клетки иммунной системы. Одним из маркеров такой активации является индукция цитокинов производство, например TNF-альфа. производство. Апоптоз индуцируя малое молекулы могут быть идентифицированы, имеющие эту активность. Эти маленькие молекулы иммуно-потенциаторы имеют потенциальную полезность в качестве адьювантов и иммуноотерапия.

[1436] в процедуре по assay (высоком скрининге объем (HTS)) для малого молекулярные иммунные потенциаторы (SMIPs), моноклеары периферической крови человека клетки (PBMC), 500 000 В мл в среде RPMI 1640 с 10% FCS, были распределено в 96 скважинных пластинах (100 000 на скважину), уже содержащих 5 . мн. М соединения в DMSO. Пбмц инкубировали в течение 18 ч при 37.степень. С. В 5% СО.SUB.2. Их способность производить цитокины внутри реакция на маломолекулярные соединения определяется с помощью модифицированного сэндвич Элиза.

[1437] кратко супернатанты из культур PBMC были проанализированы для секретируемый ФНО с использованием первичного пластинчатого связанного антитела для захвата с последующим вторичное биотинилированное анти-TNF антитело, образующее сэндвич. То затем было обнаружено биотинилированное второе антитело с использованием стрептавидин-европей и количество связанного европия определяли по формуле: время разрешило флуоресценцию. Соединения SMIP были подтверждены их TNF индуцируя деятельность которая была измерена в assay как увеличенное Европим подсчет количества клеток, инкубированных только в среде RPMI. Были отобраны "хиты" исходя из их ФНО-индуцирующей активности относительно оптимальной дозы препарата липополисахарид LPS (1 .mu.g/ml), сильный индуктор TNF. Прочность анализ и низкие предпосылки позволили для по заведенному порядку выбора хиты С.о нас.10% из деятельности при ЛПС которая нормально была между 5-10.раз. фон (только клетки). Выбранные хиты затем подвергаются подтверждение их способности индуцировать цитокины от нескольких доноров при уменьшении концентрации. Эти соединения обладают постоянной активностью при или ниже 5 .mu. М считаются подтвержденными для целей настоящего анализа. Анализ охотно доработан для экранировать для смесей эффективных на более высокая или более низкая концентрация.

Метод 2

[1438] каждое из соединений в приведенной выше таблице 34 вызывало TNF-альфа. продукция в периферической крови человека моноклеарных клеток. Многие из них: соединения проявляли активность на уровне менее 20 .mu. М по отношению к производство ФНО-альфа. Многие из этих соединений проявляли активность при меньше чем 5 .mu. М по отношению к продукции TNF-альфа. Многие из них эти соединения проявляли активность в производстве ФНО-альфа. по меньшей мере чем 1.5 .mu. М.

[1439] по этой причине каждая из R групп любого из соединений перечисленные в таблице 34 являются предпочтительными. Дополнительно, из-за превосходного активности каждого из соединений, каждое из этих соединений является индивидуально предпочтительный и предпочтен в качестве члена группы, которая включает любое или все другие соединения, и каждое соединение предпочтительно в способах модулирующей иммунопотенциации и в способах лечения биологические условия связанные с этим, например быть использованным как а вакцинный адьювант. Каждое из соединений также предпочтительно для использования в приготовление лекарственных средств для вакцин, иммунопотенцирование, редукция опухолевый рост и при лечении опосредованных им биологических состояний.

[1440] в дополнение к процедуре, описанной выше, методы измерения другие цитокины (например, IL-1-бета, IL-12, IL-6, IFN-гамма, IL-10 и др.) AP хорошо известный в искусстве и может быть использован для поиска активных соединений SMIP из настоящее изобретение.

[1441] соединения могут быть полезны, которые вызывают продукцию TNF-альфа. около более высокие концентрации, такие как 100 .mu.M, 200 .mu.M или 300 .mu.M в воде: анализы, описанные здесь. Например, Локсорибин вызывает полезное производство из ФНО-альфа. at 300 .mu. M (см. Pore et al иммуностимулирующее соединение 7-аллил-8-Оксогуанозин (Локсорибин) индуцирует отдельное подмножество мышей Цитокины Клеточная Иммунология 162: 333-339 (1995)).

[1442] предметное изобретение также включает изотопно-Меченый противовирусный препарат соединения, которые структурно идентичны тем, что были раскрыты выше, но за то, что один или несколько атомов заменены атомом, имеющим атомная масса или массовое число, отличное от атомной массы или массового числа обычно встречается в природе. Примеры изотопов, которые могут быть включены в состав противовирусных соединений изобретения входят изотопы водорода, углерод, азот, кислород, фосфор, сера, фтор и хлор, такие как .отхлебывать.2H,.отхлебывать.3H,.отхлебывать.13C,.отхлебывать.14C,.отхлебывать.15N,.отхлебывать.18O,.отхлебывать.17O,.отхлебывать.31P,.отхлебывать.32P,.отхлебывать.35S,.отхлебывать.18F И.отхлебывать.36Cl, соответственно. Противовирусные соединения настоящего изобретения, производные их фармацевтически приемлемые соли, а также фармацевтически приемлемые соли указанных соединений и их фармацевтически приемлемых солей указанные производные, содержащие вышеупомянутые изотопы и / или другие изотопы других атомов входят в сферу применения этого изобретения. Определенный изотопно-меченые противовирусные соединения настоящего изобретения, для пример тех, в которых радиоактивные изотопы такие как .отхлебывать.3ч и .отхлебывать.14C включены, полезны в ткани снадобья and / or субстрата анализы распределения. То есть трехцветный .отхлебывать.3H, и углерод-14, т. е., .отхлебывать.14C, изотопы особенно предпочтительны для их легкости подготовки и обнаруживаемость. Далее, замена на более тяжелые такие изотопы, как дейтерий, например .отхлебывать.2H, может позволять некоторое терапевтическое преимущества вытекающие из большей метаболической стабильности, например увеличенное внутри-полувыведение vivo или уменьшенные требования к дозировки и, следовательно, может быть предпочтительным в некоторых обстоятельствах. Изотопно Меченый противовирусный препарат соединения настоящего изобретения и их производные могут в общем случае быть подготовлено путем проведения известных или ссылочных процедур и путем замена легкодоступного изотопно Меченого реагента на а неизотопно Меченый реагент.

[1443] в соответствии с настоящим изобретением предусмотрены способы для администрация эффективного количества соединения SMIP для того чтобы подействовать как вспомогательный. Также предоставляются иммуногенные композиции, содержащие SMIP соединение, антиген и, возможно, другие адъюванты.

[1444] в качестве адъювантов соединения SMIP комбинируются с антигенами и системы доставки для формирования конечной иммуногенной композиции или вакцины продукт.

[1445] в качестве иммунотерапевтических средств соединения SMIP используются самостоятельно или в комбинация с другими видами терапии для лечения ОРВИ.

[1446] те, кто обладает обычным навыком в этом искусстве, признают, что физиологически активные противовирусные соединения, SMIPs или SMISs, которые имеют доступные гидроксильные группы часто вводят в виде фармацевтически приемлемые сложные эфиры. Противовирусные соединения этого типа изобретение может быть эффективно введено в виде сложного эфира, образующегося на поверхности гидроксигруппы, так же, как один опытный в фармацевтической химии будет ожидать. Это возможно, как уже давно известно в фармацевтике химия, для того чтобы отрегулировать тариф или продолжительность действия противовирусного составе соответствующими выборами эстерных групп.

[1447] другие соединения, которые могут быть использованы в сочетании с описанные здесь терапевтические агенты включают, Пентоксифиллин (PTX), метилпреднизолон, триметрексат (Нейтрексин), Цадаксин (тимозин альфа 1), необязательно замещенные 5-аминометинимино-3-метил-4-изоксазолкарбонные кислоты фениламида кислоты, циклоспорин А (CsA), 6-оксо-1,4,5-тиадиазин[2,3-b]хиназолин, 3-амино-2 (1H) - тиюксо-4 (3H) - хиназолинон, гангцикловир, глицирризин, тетрациклины, аминокгликозиды, хинолоны, бициклам (1,4-бис (1,4,8,11-тетраазациклотетрадек-1-илметил)бензол октагидрохлориддигидрат), рапаминцин, вортманнин, Эналаприл, рохинимекс / линомид, инактивин, DNCB, AG7088, 9-аминокамптотецин (CPT-11), локсоробин, бропирин, Ононаза .PTM. (gapimase), статины, например: ловастатин--Мевакор.PTM., правастатин -- Правачол.PTM., симвастатин--Зокор.PTM., флувастатин--Лескол.PTM., аторвастатин -- Липитор.PTM. а розувастатин -- Крестор.PTM..

[1448] как используется здесь, термин "эффективная сумма" означает сумму противовирусное соединение композиций, наборов и способов настоящего времени изобретение, способное лечить описанные симптомы условия. Специфическая доза смеси управляемая согласно это изобретение, конечно же, будет определяться конкретным обстоятельством, связанные с этим делом, включая, например, состав администрирование, маршрут администрирования, состояние бытия объекта пациент, и тяжесть состояния в настоящее время лечится.

[1449] доза противовирусного соединения настоящего изобретения должна быть: введенный к предмету довольно широко переменн и подлежит к решение лечащего врача. Следует отметить, что это может быть и так необходимо регулировать дозу того или иного соединения при его введении в организм. форма соли, например Лауреат, солеобразующая моность которого имеет заметная молекулярная масса.

[1450] следующие количества дозировки и другие установленные количества дозировки в другом месте этого описания находятся для среднего человеческого субъекта, имеющего а вес от примерно 65 кг до примерно 70 кг. Опытный практикующий врач будет охотно сможете определить количество дозировки требуемое для вопроса вес которого падает вне ряда 65 kg к 70 kg, основанного на история болезни субъекта и наличие заболеваний, например:, сахарный диабет, в тему. Расчет количества дозировки для прочих формы свободной низкопробной формы как соли или гидраты легко выполняется путем выполнения простого соотношения относительно молекулярного веса участвующих видов.

[1451] в общем случае фармацевтические композиции будут включать по меньшей мере одно противовирусное соединение в комбинации с фармацевтически приемлемым корабль, как солончак, амортизированный соляной раствор, декстроза 5% в воде, Борат-забуференный физиологический раствор, содержащий микрометаллы или тому подобное. Формулировка может дополнительно включать один или несколько вспомогательных веществ, консервантов, солюбилизаторов, буферные агенты, смазочные материалы, наполнители, стабилизаторы и др. Методы проведения формулировки хорошо известны в искусстве и раскрываются, например, в "Фармацевтические науки Ремингтона", паб Мака. Со., Нью-Джерси (1991) или "Ремингтон: Наука и практика фармации", 20.sup.th -ред., Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, Md. (2000), включенный здесь по ссылке.

[1452] фармацевтические композиции для применения в рамках настоящего изобретения может быть в виде стерильных, непирогенных жидких растворов или суспензии, покрытые оболочкой капсулы, суппозитории, лиофилизированные порошки, трансдермальные пластыри или другие формы, известные в искусстве.

[1453] многие из действующих веществ противовирусных соединений, как известно, являются всасывается из желудочно-кишечного тракта, и поэтому обычно предпочтительнее, чтобы администрирование смеси перорально по причинам удобства. Тем не менее, the соединения могут одинаково эффективно вводиться внутривенно, подкожно, перкутанно, или как суппозитории для абсорбции прямая кишка или влагалище, если это необходимо в данном случае. Все из обычных типов из композиций могут быть использованы, в том числе таблетки, жевательные таблетки, капсулы, растворы, парентеральные растворы, трохи, суппозитории и подвески. Составы сформулированы для того чтобы содержать ежедневную дозу, или а удобная фракция суточной дозы, в единице дозировки, которая может быть разовой таблетка или капсула или удобный объем жидкости.

[1454] капсулы получают путем смешивания соединения или соединений с а соответствующий разбавитель и заполнять правильное количество смеси внутри капсулы. К обычным разбавителям относятся инертные порошкообразные вещества, такие как крахмал много различных видов, напудренная целлюлоза, специально кристаллическая и микрокристаллическая целлюлоза, сахара, такие как фруктоза, маннит и сахароза, мука зерна и подобные съедобные порошки.

[1455] таблетки получают прямым прессованием, влажной грануляцией, или путем сухого гранулирования. Их составы обычно включают разбавители, вяжущие вещества, смазочные материалы и дезинтеграторы, а также состав или соединений. Типичные разбавители включают, например, различные типы крахмал, лактоза, маннит, каолин, фосфат кальция или сульфат, неорганические соли, такие как хлорид натрия и сахарная пудра. Напудренный производные целлюлозы также полезны. Типичные связыватели таблетки такие вещества, как крахмал, желатин и сахара, такие как лактоза, фруктоза, глюкоза и тому подобное. Натуральные и синтетические десны также удобны, включая акацию, альгинаты, метилцеллюлозу, поливинилпирролидин и подобный. Полиэтиленгликоль, этилцеллюлоза и воски также могут служить в качестве связующее вещество.

[1456] смазка вообще необходима в образовании таблетки к предотвратите планшет и удары от вставлять в плашку. Смазка есть выбирается из таких скольких твердых веществ как тальк, стеарат магния и кальция, стеариновая кислота и гидрогенизированные растительные масла.

[1457] дезинтеграторы таблеток-это вещества, которые набухают при смачивании до разбейте таблетку и освободите соединение или соединения. Они включают в себя: крахмалы, глины, целлюлозы, альгины и десны, в частности, кукуруза и картофельные крахмалы, метилцеллюлоза, агар, бентонит, древесная целлюлоза, напудренная натуральная губка, катионообменные смолы, альгиновая кислота, гуаровая камедь, также можно использовать цитрусовую мякоть и карбоксиметилцеллюлозу, например как лаурилсульфат натрия.

[1458] таблетки часто покрывают сахаром в качестве ароматизатора и герметика, или с пленкообразующими защитными веществами для изменения свойств растворения из скрижали. Соединения также могут быть сформулированы в виде жевательных таблеток, путем использование относительно большого количества веществ приятн-дегустации как маннит в рецептуре, как сейчас хорошо зарекомендовал себя в искусстве.

[1459] когда пожелано управить смесью как суппозиторий, то типичные основания могут быть использованы. Какао-масло является традиционным суппозиторию основание, которое может быть модифицировано добавлением восков для повышения его плавления наемкнул слегка. Водосмешиваемые суппозиторные основы, содержащие, в частности, полиэтиленгликоли различной молекулярной массы находятся внутри широкого использование.

[1460] действие соединений может быть замедлено или продлено за счет правильного формулировка. Например, медленно растворимая гранула соединения может быть подготовлено и включено в таблетку или капсулу. Методика может быть такой улучшено путем делать лепешки нескольких различных тарифов растворения и наполнение капсул смесью из гранул. Таблетки или капсулы могут быть покрытым пленкой, которая сопротивляется растворению в течение предсказуемого периода - о времени. Даже парентеральные препараты могут быть сделаны длительного действия путем растворение или суспендирование соединения или соединений в маслянистой или эмульгированной среде корабли которые позволяют рассеиванию медленно в сыворотке.

[1461] комбинация этого изобретения могут быть введены в виде состав для контролируемого высвобождения, такой как медленное высвобождение или быстрое высвобождение формулировка. Такие составы с контролируемым высвобождением комбинации это изобретение может быть подготовлено с использованием методов, хорошо известных специалистам в искусстве. Способ введения препарата будет определяться следующим образом: дежурный врач или другое лицо, квалифицированное в данной области после оценка состояния объекта и его требований.

[1462] термин "пролекарство" означает соединения, которые трансформируются *in vivo* в получают противовирусное соединение настоящего изобретения. Преобразование может происходить по различным механизмам, таким как через гидролиз в крови. Один хорошее обсуждение использования пролекарств обеспечивается Т. Higuchi и W. Стелла, "про-наркотики как новые системы доставки", т. 14 из А. С. С. Серия симпозиумов, и в Биореверсильных носителях в дизайне лекарств, изд. Эдвард Б. Рош, американская фармацевтическая ассоциация и Pergamon Press, 1987. Термин "пролекарство" также охватывает взаимные пролекарства, в которых один или более противовирусные соединения объединяются в одну молекулу, которая может затем подвергают трансформации с получением индивидуальных противовирусных соединений настоящего изобретения.

[1463] например, если противовирусное соединение настоящего изобретения содержит функциональную группу карбоновой кислоты, пролекарство может состоять из сложной эфир, образованный замещением атома водорода кислой группы с такой группой, как (C. sub.1-C. sub.8) алкил, (C. sub.2-C. sub.12) алканоилюксиметил, 1 - (алканоилюкси)этил, имеющий от 4 до 9 атомов углерода, 1-метил-1 - (алканоилюкси) - этил, имеющий от 5 до 10 атомы углерода, алкоксикарбонилюксиметил, имеющие от 3 до 6 атомов углерода, 1 - (алкоксикарбонилюкси)этил, имеющий от 4 до 7 атомов углерода, 1-метил-1 - (алкоксикарбонилюкси)этил, имеющий от 5 до 8 атомов углерода, N - (алкоксикарбонил)аминометил, имеющий от 3 до 9 атомов углерода, 1-(N - (алкоксикарбонил)амино)этил, имеющий от 4 до 10 атомов углерода, 3 - фталидил, 4-кроднолактонил, гамма-бутиролактон-4-ил, di-N, N-(C. sub.1-C. sub.2) алкиламино (C. sub.2-C. sub.3) алкил (как .бета.-диметиламиноэтил), карбамоил-(C. sub.1-C. sub.2) алкил, N, N-di (C. sub.1-C. sub.2) алкилкарбамоил-(C. sub.1-C. sub.2) алкил и пиперидино -, пирролидино - или морфолино(C. sub.2-C. sub.3) алкил.

[1464] аналогично, если противовирусное соединение настоящего изобретения состоит из функциональной группы спирта, пролекарство может быть сформировано путем замена атома водорода спиртовой группы на группу такую as (C. sub.1-C. sub.6) алканоилюксиметил, 1-((C. sub.1-C. sub.6) алканоилюкси) этил, 1-метил-1 - ((C. sub.1-C. sub.6) алканоилюкси) этил, (C. sub.1-C. sub.6) алкоксикарбонилюксиметил, N-(C. sub.1-C. sub.6) алкоксикарбониламинометил, сукциноил, (C. sub.1-C. sub.6) алканоилюксиметил, .альфа.- амино(C. sub.1-C. sub.4) алканоилюксиметил, ариалцил И.альфа.- аминоацил, ор .альфа.- аминоацил-.альфа.-аминоацил, где каждый .альфа.- группа аминокислоты независимо выбрана от природных L-аминокислоты, P (O) (OH).SUB.2, -- P (O) (O (C. sub.1-C. sub.6) алкил).SUB.2 или гликозил (полученный радикал из удаления гидроксильной группы гемиацетальной формы а углеводный).

[1465] если противовирусное соединение настоящего изобретения содержит функциональная группа Амина, пролекарство может быть сформирована заменой а атом водорода в Аминовой группе с такой группой, как R. sup.X-карбонил, P. sup.XO-карбонил, н. sup.XP.отхлебывать.X' - карбонил, где R. sup.X и R. sup.X' являются каждый независимо ((C. sub.1-C. sub.10) алкил, (C. sub.3-C. sub.7) циклоалкил, бензил или R. sup.X-карбонил является естественным .альфа.- аминоацил или натуральный .альфа.- аминоацил-натуральный .альфа.-аминоацил, -- C (OH)C(O) OY.отхлебывать.X где (Y. sup.X - это H, (C. sub.1-C. sub.6) алкил или бензил), --C (OY.отхлебывать.XO) Y. sup.X1, где Y. sup.XO-это (C. sub.1-C. sub.4) алкил и Y. sup.X1 - это ((C. sub.1-C. sub.6) алкил, карбокси (C. sub.1-C. sub.6) алкил, амина (C. sub.1-C. sub.4) алкил или моно-N-или di-N, N--(C. sub.1-C. sub.6) алкиламиноалкил, --C (Y. sup.X2) Y. sup.X3 где Y. sup.X2 - это H или метил и Y. sup.X3-это моно-N-или di-N, N--(C. sub.1-C. sub.6) алкиламино, морфолино, пиперидин-1-ил или пирролидин-1-Ил.

[1466] композиции для применения в соответствии с настоящим изобретением может быть сформулирован обычным способом с использованием одного или нескольких физиологически приемлемые носители или вспомогательные вещества. Противовирусный, SMIP, SMIS, или другие иммуномодулирующие соединения получают или получают согласно описанию здесь и в патентах США и опубликованном международном патенте заявки перечислены в Таблице 1, таблице 2, таблице 34 и таблице 35. То противовирусные соединения могут быть сформулированы в фармацевтически приемлемых формах композиции, пригодные для доставки в легкие. Особые формулировки включают сухие порошки, жидкостные разрешения или подвесы соответствующие для небулизационные и топливные составы, пригодные для применения в дозированных дозах ингаляторы. Приготовление таких рецептов хорошо известно тем, кто квалифицированный в этом искусстве, и описывается в США Пат. № 5,814,607 и 5,654,007 и в патентах США и опубликованном международном патенте заявки, перечисленные в таблице 3, раскрытие которых включено здесь по ссылке.

[1467] сухие порошковые составы будут содержать противовирусное соединение В а сухая, необязательно лиофилизированная форма с размером частиц в пределах предпочтительного ряд для низложения внутри легкого. Типично размер частицы для отложение в легком будет колебаться между 1 и 5. мк. м. когда системный поставка противовирусной смеси через абсорбцию от легкого в в кровотоке желателен состав противовирусного соединения размер частиц обычно составляет от 0,1 до 2. мк.м в размере. Предпочитаемый ряд размера частицы могут быть получены с использованием таких методов, как струйное измельчение, распылительная сушка и осаждение растворителем, например. Сухие приборы порошка типично требуется порошковая масса в диапазоне примерно от 1 мг до 100 мг для получения аэрозольная доза. Таким образом, противовирусная смесь типично будет совмещенный с фармацевтически приемлемым сухим сыпья порошок. Предпочтительный сухие сыпья порошки включают сахарозу, лактозу, trehalose, людскую сыворотку альбумин (HSA), фосфолипиды и глицин так же, как те раскрытые внутри документы, перечисленные в таблице 3. Сухие порошки можно управить к предмет в обычных сухих порошковых ингаляторах. Для жидкостных образований the противовирусное соединение можно растворить в любом физиологически признанном препарате приемлемый носитель для использования при доставке аэрозольных составов. Такой несущие включают

амортизированные и unbuffered водные растворы для воды растворимые соединения и физиологические растворы, включая физиологический раствор (предпочтительно между 0,2 и 2 N NaCl). Для противовирусных соединений с ограниченной растворимостью, другие жидкостные носители как этанол, пропилен могут использоваться гликолевые и этанол-пропиленовые комбинации. Противовирусный препарат соединения могут также вводиться в виде твердых частиц во взвешенном состоянии.

[1468] для введения путем ингаляции, композиции для применения согласно настоящему изобретению удобно поставляются в виде аэрозольного баллончика, вводимого через герметичные пакеты или небулайзер, с использованием ракетного топлива, например воздуха, дихлордифторметана, дихлортерафторэтан или другой подходящий газ. Предпочтительно, для включения в состав аэрозольного пропеллента, противовирусного соединения рецептуры настоящего изобретения будут переработаны на респирабельные частицы как описано выше для сухих составов порошка. То затем частицы взвешиваются в топливе, необязательно покрываясь оболочкой с поверхностно-активным веществом для повышения их расхождения. При использовании а надутый аэрозоль блок дозировки может быть определен путем обеспечивать а клапан для того чтобы поставить измеренное количество.

[1469] коммерчески доступные струйные распылители доступны и могут быть использованный для того чтобы поставить аэрозольную противовирусную смесь к вопросу. Такая струя небулайзеры включают в себя, но не ограничиваются ими, поставляемые компанией AeroTech 11 (СНГ-США, Бедфорд, масс.). Кроме того, для доставки аэрозолей противовирусное соединение для легких субъекта источником кислорода может быть: прикрепленный к распылителю обеспечивающий расход потока, например, 10 л/мин. В общем случае ингаляция выполняется в течение 5-40 минут интервал через мундштук во время спонтанного дыхания. Настоящий изобретение предусматривает новые композиции, содержащие подходящий носитель и аэрозольное противовирусное соединение в дозах, достаточных для снижения или улучшение вирусной нагрузки и симптомов ОРВИ у лиц, имеющих ОРВИ. Такой дозы могут быть более низки чем соответствую внутрирастительные дозы которые могут быть использованы к те, которые обычно используются для уменьшения или улучшения вирусной нагрузки и симптомов ОРВИ у испытуемых, имеющих ОРВИ.

[1470] противовирусные, SMIP, SMIS и иммуномодулирующие композиции настоящее изобретение может быть введено со стероидным препаратом противовоспалительный препарат для лечения ОРВИ и ее симптомов. Примеры стероидных противовоспалительных препаратов изобретения включают: гидрокортизон, преднизолон, дексаметазон, триамцинолона ацетонид, ацетонид fluocinolone, ацетат fludrocortisone, betamethasone, etc.

[1471] противовирусная композиция соединения по изобретению распыляется преимущественно в размеры частиц, позволяющие осуществлять доставку лекарственного препарата внутрь терминальные и дыхательные бронхиолы. Для эффективной доставки противовирусное соединение к эндобронхиальному пространству легких дыхательных путей в Ан аэрозоль, образование аэрозольных частиц, имеющих среднюю массу диаметр преимущественно между 1 до 5. μ m. n необходимо. Формулировка необходимо дополнительно предусмотреть условия, которые бы не оказали отрицательного влияния на функциональные возможности дыхательных путей. Следовательно, формулировка должна содержать: достаточно препарата, сформулированного в тех условиях, которые позволяют его эффективная поставка пока во избежание нежелательная реакция.

[1472] для жидких растворов и суспензий, выбор распылителя изготавливается из числа коммерчески доступных небулайзеров. Струйные распылители известный как Sidestream O, полученный из Medicaid и Pari LCS, LC Plus, и eFlow получено от дыхательного оборудования Pari, Richmond, Va., AP примеры типичных небулайзеров, пригодных для практики применения изобретение. Ультразвуковые распылители, которые производят соответствующие размеры частиц около 1 до 5. μ m. m как Aerosonic DeVilbiss и UltraAire мимо Omron также подходят.

[1473] предпочтительно, настоящее изобретение также предусматривает набор для использование потребителем для лечения и/или профилактики ОРВИ. Вот такой комплект содержит: (а) фармацевтическую композицию, содержащую терапевтически эффективное количество по меньшей мере одного соединения из числа описанных здесь или перечисленный в таблице 34 и таблице 35 или описанный в США. Патенты и опубликованные международные патентные заявки, перечисленные в таблице Таблица 1, Таблица 2, Таблица 35 и фармацевтически приемлемый носитель, транспортное средство или разбавитель; b) контейнер для хранения фармацевтического препарата состав; и, необязательно, (с) инструкции, описывающие метод применение фармацевтических композиций для лечения и / или профилактики заболеваний профилактика ОРВИ. Комплект может дополнительно содержать несколько противовирусные соединения для лечения ОРВИ, где анти-вирусный соединения выбираются из ЗС-подобных ингибиторов протеаз и папаиноподобных ингибиторов протеазы. В более дальнейшем варианте осуществления, набор содержит противовирусное соединение, являющееся РНК-зависимым ингибитором РНК-полимеразы. Когда набор содержит больше чем одно противовирусное соединение, то противовирусный соединения, содержащиеся в комплекте, могут быть необязательно объединены в одно целое фармацевтическая композиция.

[1474] "комплект", используемый в мгновенном приложении, включает контейнер для содержания отдельных композиций, таких как разделенная бутылка или а разделенный пакет фольги. Контейнер может быть в любой обычной форме или форма как известно в искусстве которое сделано фармацевтически приемлемого материал, например бумажная или картонная коробка, стеклянная или пластиковая бутылка или баночку, переуплотняющуюся в пакет (например, для удержания "пополнения" таблеток для размещения в другой контейнер), или пакет волдыря с индивидуальным дозы для выдавливания из пачки назначаются согласно терапевтическому графику. Используемый контейнер может зависеть от точной включенной лекарственной формы, например пример обычная картонная коробка обычно не используется для хранения жидкая суспензия. Вполне возможно, что более одного контейнера может быть используется совместно в одной упаковке для реализации одной лекарственной формы. Для например, таблетки могут содержаться в бутылке, которая в свою очередь содержится внутри коробки.

[1475] примером такого комплекта является так называемая блистерная упаковка. Волдырь пакеты хорошо известны в упаковочной промышленности и широко используются для упаковки фармацевтического блока используются лекарственные формы (таблетки, капсулы, и тому подобное). Пакеты волдыря вообще состоят из листа относительно жесткий материал, покрытый фольгой из предпочтительно прозрачного пластика материал. Во время упаковывания процесса, гнезда сформированы в полимерная пленка. Углубления имеют размер и форму отдельных таблеток или капсулы, котор нужно упаковать или могут иметь размер и форму для того чтобы приспособить несколько таблеток и / или капсул, которые нужно упаковать. Далее, таблетки или капсулы помещены в гнездах соответственно и лист относительно жесткий материал загерметизирован против пластиковой фольги на стороне из фольги, которая находится напротив направления, в котором углубления были сформированы. В результате, таблетки или капсулы индивидуально загерметизированы или совместно загерметизированный, как пожелано, в гнездах между пластмассой фольга и лист. Предпочтительно прочность листа такова, что таблетки или капсулы могут быть удалены из блистерной упаковки вручную прикладывая давление на гнезда whereby отверстие сформировано в простыня на месте углубления. Таблетка или капсула могут после этого быть удаляется через указанное отверстие.

[1476] возможно, желательно предоставить помощь в письменной памяти, где записанное запоминающее устройство относится к типу, содержащему информацию и/или инструкции для врача, фармацевта или субъекта, например, в форме: числа рядом с таблетками или капсулами, которым соответствуют числа с днями режима, которые таблетки или капсулы так указаны должна быть проглочена или карта, содержащая однотипную информацию. Еще одним примером такого средства памяти является календарь, напечатанный на карте например, следующим образом: "первая неделя, Понедельник, Вторник". . . и тд. . . "Второй Неделя, Понедельник, Вторник, . . ." прием. Другие варианты средств памяти будут будьте легко заметны. "Суточная доза" может быть одной таблеткой или капсулой или несколько таблеток или капсул, которые следует принимать в тот или иной день. Также суточная доза одного или нескольких компонентов комплекта может состоять из одной таблетки или капсула в то время как суточная доза другого одного или нескольких компонентов комплекта может состоять из нескольких таблеток или капсул.

[1477] еще одним конкретным вариантом исполнения комплекта является дозатор, предназначенный для дозируйте суточные дозы по одному в порядке их назначения использовать. Предпочтительно, диспенсер оснащен памятью-помощником, с тем чтобы дополнительно облегчите соблюдение режима. Пример такого рода: metogly-aid-это механический счетчик, который показывает количество ежедневных операций. дозы, которые были распределены. Другим примером такого средства для восстановления памяти является аккумуляторная микросхема памяти в сочетании с жидкокристаллическим считывателем, или звуковой сигнал напоминания, который, например, считывает дату, что была принята последняя суточная доза и / или напоминает одно когда следующая доза это должно быть принято.

ПРИМЕРЫ

Пример 1

Пример изолята вируса SARS

[1478] вирус ОРВИ был выделен из клинических образцов пациента в США. Франкфурт, Германия (FRA). Изолят выращивали в клетках Vero. РНК самого Вируса ОРВИ был выделен и амплифицирован методом от-ПЦР. Нуклеотидная последовательность вирусного генома был определен путем прямого секвенирования продукта ПЦР. Компьютерный анализ был использован для прогнозирования особенностей генома, чтобы сравните его с ранее известными коронавирусами и с последовательностью различные изоляты вируса ОРВИ.

[1479] более конкретно, изоляция и последовательность были выполнены как следует. После третьего прохождения вируса ОРВИ в клетках Vero, вирусные частицы были очищены ультра центрифугированием от 3.раз.10.отхлебывать.7 супернатант клеток. Вирусная РНК была выделена методом триазола (Gibco-BRL). Вирусная РНК (200 НГ) была транскрибирована в кднк с птицами RNaseH-термостабильная обратная транскриптаза, следующая инструкциям производитель (ThermoScript RT System, Invitrogen). Короче говоря, либо 50 pmoles олиго (dT).SUB.20 (SEQ ID NO: 7389) или 25 нг случайных гексамеров были использованы для Прайма реакции RT в конечном объеме 20.μl. Амплификация и секвенирование генома SARS были выполнены путем прямое секвенирование продуктов ПЦР, полученных с помощью: i) специфических праймеров из сохранные области гомологии, найденные путем множественного выравнивания среди известные коронавирусы; ii) олигонуклеотиды, сконструированные вокруг коротких последовательностей изоляты торс доступны в Интернете через сетевые лаборатории ВОЗ; iii) дегенеративные праймеры для амплификации смеси кднк с множественными перекрывающиеся фрагменты как конечные продукты. Закрывание зазора было осуществлено длиной дистанционная ПЦР с высокой точностью Taq (Expand High Fidelity system, Roche) использование праймеров, разработанных на выбранных фрагментах. Последовательность была собрана с помощью праймер ходьба с использованием биохимии Терминатора BigDye (Applied Biosystems) и автоматизированный секвенсор ДНК (3700 капиллярная модель, Прикладная Биосистемы). После получения первого прохождения всего генома, набор как прямой, так и обратный праймеры были использованы для усиления и последовательности de Ново геном, использующий в качестве шаблона сегменты ДНК размером в среднем 2 КБ. Показания от перекрывающихся фрагментов были автоматически собраны с помощью Автоассемблер (Applied Biosystems) и 29 740 BP contiguous edited вручную.

[1480] компьютерный анализ последовательности был выполнен следующим образом. То Для компьютерного анализа использовался пакет GCG Wisconsin Package suite (версия 10.0 последовательностей генов и белков. Программа PSort (<http://psort.nibb.ac.jp/>) был использован для прогнозирования локализации. Для вторичный анализ структуры, программное обеспечение PHD доступное на сети на <http://cubic.bioc.columbia.edu/predictprotein/> was приложил. Пси-взрыв алгоритм был использован для поиска гомологии (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) используя не-резервный протеин База данных. ClustalW был применен для получения нескольких последовательностей выравниваний последовательности генов и белков. Программа LearnCoil-VMF была использована для прогнозирования спирально-спиральной области в спайковых белках (<http://learncoil-vmf.lcs.mit.edu/cgi-bin/vmf>). лейциновые молнии были прогнозируется с помощью программы 2ZIP, доступной по адресу <http://2Zip.molgen.mpg.de-da>.

[1481] филогенетический анализ проводили с использованием метода соседнего присоединения алгоритм, реализованный в программе Neighborhood в рамках филогении Пакет заключений (Phylip) (Felsenstein J 1993, program distributed by автор). Бутстрэп-анализ всегда выполнялся со 100 репликами использование программы Seqboot. Деревья были обработаны и показаны с помощью Тривью. Программа HMMER была использована для формирования профилей последовательности из множественные выравнивания последовательности доменов S1 протеинов шипа. Впоследствии программа HMMPFAM была использована для сравнения домена S1 из Спайк SARS к профилям.

[1482] геном этого изолята вируса атипичной пневмонии составляет 29 740 оснований длиной и общая структура генома аналогична структуре трех известных геномов группы коронавирусов. Начиная с 5' конца последовательности лидеров, an непереводаемая область (UTR) и два перекрывающихся открытых кадра считывания кодирования для одного полипротеина, содержащего ферменты, необходимые для репликации, можно: быть идентифицированным. Они сопровождаются областью кодирования для Спайка (ов), оболочка (E), матрица (M), структурные белки нуклеокапсида (N) и восемь дополнительные Орф, специфичные для вируса SARS. На 3' - конце генома расположен UTR с Поли(А). Общая гомология к коронавирусам группы 1, 2 и 3 низка и поэтому вирус атипичной пневмонии принадлежит к новой группа (группа 4) коронавируса. Более детальный анализ шипа последовательность аминокислоты протеина показывает что изолят вируса SARS больше тесно связана с коронавирусной группой 2.

[1483] полная последовательность генома изолята вируса SARS составляет 29 740 bp в длину. Эта последовательность доступна в Genbank и имеет контент GC 40,8%, что сопоставимо с известными вирусами того же семейства. Структура генома аналогична структуре генома других коронавирусов. 14 открытые рамки для чтения были предсказаны. Основные признаки генома: а генная продукция проиллюстрирована представленными на фиг. 17 и таблица 10. То сравнение между геномом торс и теми из группы 1, 2 и 3 коронавирусы представлены на фиг. 18.

[1484] нуклеотиды 1-73 содержат предсказанную последовательность лидера РНК, за которой следует по непередаваемой области (UTR) из 197 нуклеотидов. За UTR следует 2 перекрывающаяся открытыми рамками чтения (ORF1a, ORF1b), которые включают две трети генома (нуклеотиды 265-21485). Они кодируют по большому счету полипротеин, который, как предполагается, будет обработан вирусными протеазами до сгенерируйте комплекс репликазы. 3' часть генома содержит следующие компоненты: гены, кодирующие четыре структурных белка (S, spike protein, E, белок оболочки, м, матричный гликопротеин и N, нуклеокапсидный белок), и восемь предсказанных Орфов неизвестной функции (рис. 17). И, наконец, в конце концов, у 3' конец генома, мы нашли второе UTR 340 оснований следовать а тракт Поли (а). Мы также определили предполагаемую интергенную последовательность (IG) называется транскрипционно-ассоциированной последовательностью (TAS), которая представляет собой типичная особенность для коронавирусов. Последовательность IG охарактеризована мимо 6-18 нуклеотидов присутствующих на 3' конце лидера и могут быть найдены внутри перед каждым геном. Последовательность IG играет ключевую роль в транскрипции РНК и его регулирование. Последовательность IG вируса атипичной пневмонии характеризуется: последовательность SEQ ID NO: 7293 и присутствует в геноме девять раз (ИНЖИР. 17). Последовательность действий лидера и ИГ свойственна каждому из них коронавирус и представляют собой специфическую сигнатуру для вируса.

Область Реплик

[1485] ген репликазы, ORF1ab (SEQ ID NO: 7232), состоит из двух перекрывающиеся ORFs, ORF1a и ORF1b, которые могут быть переведены как один полипротеин путем сдвига рамки рибосомы в положении 13,393, внутри область кодирования полимеразы. См. Brierley et al, Embo J 1987: 6(12): 3779-3785. Как и ожидалось, последовательность стержень-петли присутствует десять пар оснований ниже по течению от этого объекта (SEQ ID NO: 7390; 5' - CGGTGTAAGTGACGCCCTTACACCG-3'). Полипротеин расщепляется со- и / или посттрансляционно в несколько белков своим собственным кодированием протеазы. Используя последовательность консенсуса расщепления и по аналогии с другие коронавирусы, мы нанесли на карту возможные места расщепления полипротеин и определили 14 продуктов, которые входят в состав лидера белок р28, гомолог белка МНУ р65 и других двенадцати белки, названные от nsp1 до nsp13 (nsp, non structural protein) (рис. 17 и таблица 10). Анализ аминокислотных последовательностей позволяет предположить наличие несколько функциональных мотивов внутри предполагаемые протеины ORF1ab. В в частности, мы нанесли на карту две потенциальные протеазы (nsp1 и nsp2), одна фактор роста-подобный мотив (nsp7) внутри ORF1a, тогда как в ORF1b мы идентифицировали РНК-полимеразу (nsp9) и прогнозируемую хеликозу (nsp10). Другие прогнозируемые продукты расщепления (nsp3, nsp4, nsp5, nsp6, nsp11, nsp12 и nsp13) - это белки неизвестной функции. Многие из этих белков предположительно присутствуют в комплексе репликации РНК, который является ассоциируется с мембранными структурами в инфицированных клетках. В в частности, nsp3 и nsp4 содержит гидрофобные Домены. Как показано на фиг. 18, регион репликазы SARS имеет подобную организацию к группе 1, 2 и 3 коронавируса; однако, общая консервация аминокислоты низка (Таблица 11). Наиболее консервативными белками являются полимеразы и спирали.

[1486] Nsp1 является папаин-подобной цистеиновой протеазой (PLP), которая расщепляет первые два белковых продукта (гомологи белка-лидера р28 и р65). Внутри НсП1 МНУ, два домена с папаин-подобной протеазной активностью (PLP1 и PLP2) были нанесены на карту, (Kanjanahaluethai et al (2000) J. Virol 74 (17): 7911-21), которые также сохраняются с говядиной, передаваемой вирус гастроэнтерита (ТГВ) и коронавирусы человека 229Е. Однако, путем выравнивание последовательности с SARS nsp 1, мы определили только один домен PLP содержащий каталитические остатки Cys833 и His994.

[1487] Nsp2-это химотрипсин-пикорнавирусная 3С-подобная протеаза (3CLp), который отвечает за постпереходную обработку другого 12 белков, большинство из которых расщеплены на участках Q/A или Q/S. (Ziebuhr et al (1999) J. Virol 73 (1):177-85). Он также выполняет аутопротеолитическую

активность. Основные каталитические остатки хорошо сохраняются с другими коронавирусами также находятся в положении His41 и Cys145. Кроме того, даже консервированные аминокислоты Tyr161 и His163, которые, как полагают, являются участком в распознавании субстрата и быть незаменимым для протеолитических препаратов активность, (Hegyí et al (2002) J. Gen Virol 83 (Pt3): 581-593) обнаружены в последовательности ОРВИ 3СLр.

[1488] изобретение включает последовательность orflab SEQ ID NO: 9960 и последовательность orfla SEQ ID NO: 9961, включая фрагменты, варианты, гомологи и т.д. из этого.

Структурный Регион

[1489] анализ последовательности нуклеотидов в 3' - й части атипичной пневмонии геном выявил 12 предсказанных открытых рамок для чтения. Они закодированы внутри 8.2 КБ и состоят из четырех структурных белков S, E, M и N, общих для всех коронавирусов и восьми прогнозируемых Орф, которые являются специфичными для этого вируса (рис. 18). Специфичные для SARS последовательности IG выше по течению от большинства ОРФс (ФИНИК. 17 и 18) предполагают, что большинство генов, вероятно, будут транскрибированы независимо. Интересно, что последовательности, идентичные группе 2 IG, являются также присутствуют в конце лидер РНК и перед матрицей кодирования Гена и ОРФ 10.

[1490] Спайк-это гликопротеин I типа, который образует большие спайки на поверхности вириона и отвечает за рецептор-связывание, а также слияние мембран. (Gallagher (2001) Adv Exp Med Biol 494: 183-92). То белок представляет собой 1255 остатков длиной с 17 прогнозируемыми участками N-гликозилирования. IT имеет пептид руководителя 13aa и ставить на якорь мембраны с-стержня 17 aa последовательность (1202-1218). Некоторые (MHV, HCoV-OC43, AIBV и BCoV), но не все (TGV, FIPV, HCoV-229E) спайковые белки коронавируса протеолитически расщепляется на две субъединицы, S1 и S2. Предполагается, что S1 образует луковицу головка, которая остается нековалентно связанной с с-концевой мембраной якорь. Расщепление описано основной аминокислотной последовательностью, которая напоминает последовательность консенсуса для сайта расщепления Фурина. (Garten et Аль., Biochimie 1994; 76(3-4): 217-225). Однако, в случае этого SARS вирусный изолят, мы не смогли идентифицировать такую последовательность, имплицитно что белок S этого изолята вируса атипичной пневмонии вряд ли будет расщеплен во время созревания. Вторичные предсказания структуры показали, что глобальная архитектура спайкового белка сохраняется в пределах всего известного коронавирусы. Домен S1 главным образом сформирован бета листами и вероятно принимает шаровидную складку, в то время как в домене S2 обширная Альфа спиральная прогнозируются регионы. Кроме того, программа LearnCoil-VMF, специально разработан для идентификации областей типа спиральных катушек в вирусной среде мембранно-слияние белков, предсказывает две спиральные катушки в пределах S2, охватывающие аминокислоты 900-1005 и 1151-1185 соответственно (рис. 19). Оба свернутые спиралью области содержат лейцин-молнию мотив, который также присутствует в шипах всех коронавирусов. Известно, что лейциновые молнии способствуют олигомеризации протеина; в виду того что протеины шипа формы TГВ и МХВ гетеро-тримеры, (Delmas et al, J Virol 1990; 64(11):5367-5375) (Годеке, и др., J Virology 2000; 74 (3): 1566-1571) вполне возможно, что при ОРВИ лейциновые молнии играют определенную роль в стимулировании и / или стабилизации аналогичного процесса четвертичная структура. Протеин шипа играет главную роль в биологии коронавирусов, потому что домен S1 содержит рецептор-связывание домен и вирус нейтрализующие эпитопы, в то время как домен S2 является участвует в процессе слияния мембран, что очень важно для вируса инфекционность. Как и ожидалось, множественное выравнивание последовательности различного Спайка белки показали большую степень изменчивости в пределах домена S1, тогда как S2 более сохранен.

[1491] белок оболочки E является очень коротким полипептидом 76 AA, участвует в морфогенезе оболочки вириона. (Godet et al., Вирусология 1992; 188(2):666-675). Компьютерный анализ прогнозирует долгий трансмембранный домен, близкий к N-концеву, и два N-гликозилирования Сайты. Уровень сходства аминокислот с другими коронавирусами очень высок низкая и самая лучшая гомология с малым протеином габарита вирус трансмиссивного гастроэнтерита (ТГВ).

[1492] матричный гликопротеин (M) представляет собой 221-остаток полипептида с а прогнозируемая молекулярная масса 25 КДА. Компьютерный анализ предсказывает а топология, состоящая из короткого аминотерминального эктодомена, три трансмембранные сегменты и карбоксильный конец, расположенный внутри сторона вирусной оболочки. По аналогии с матричным гликопротеином из TGV, что из вируса птичьего инфекционного бронхита (AIBV) и того из гипервирулентный штамм MHV-2 гликопротеин SARS M является N-гликозилированным при n-конец. Белок SARS M имеет наибольшее сходство с группой 2 вирусы (таблица 11).

[1493] наконец, нуклеокапсидный белок N представляет собой 397-остаток длиной фосфопротейн который взаимодействует с вирусной геномной РНК для того чтобы сформировать нуклеокапсидный. Уровень сохранности с другими коронавирусами низкий, колебаясь от 26.9% идентичности с HCoV-229E до 37.4% идентичности к Бычий коронавирус (BCoV) (таблица 11). Эпитопный анализ из был выполнен нуклеокапсидный белок (Li et al. (2003) Geno Prot & Bioinfo 1: 198-206), в котором эпитопный участок на оконечности с белок был расположен как SEQ ID NO: 7394 (аминокислоты 371-407 SEQ ID NO: 6052).

[1494] в дополнение к вышеуказанным фундаментальным белкам, многие вирусы выразите набор других пептидов, которые вообще необязательны для жизнеспособность, но может влиять на инфекционный потенциал вируса. (de Naan et al., Вирусология 2002; 296(1):177-189). Эти белки, как правило, являются сохраняются внутри членов одной серогруппы, но сильно отличаются друг от друга среди групп. По этой причине их обычно называют как группоспецифические белки (рис. 11). Члены группы 1, предствленные здесь по HCoV-229E, имеют два группоспецифических гена, расположенных между S и гены E, а иногда один или два ОРФс ниже по течению от гена N., предшествующий области 3' UTR генома. Вирусы группы 2, с MHV как прототип, имеет два группоспецифических гена (2a и HE) между ORF1b и S, а также другие два между генами S и E. Наконец, группа 3 вирусы, представленные прототипом AIBV, имеют два группоспецифических гена между S и E и двумя другими между генами M и N.

[1495] за исключением гемагглютининэстеразы HE, для которой выявлены ферментативные активности гемагглютинации и ацетилэстеразы продемонстрировано, что все другие группоспецифические ОРФс кодируют белки, которые роль пока не установлена.

[1496] интересно, что расположение специфических генов при ОРВИ геном специфичен, и предсказанные ОРФс не показывают ничего существенного гомология с Орфами, присутствующими в других коронавирусах, ни с какими другими известен белок из разных организмов. Как и вирусы из группы 1 и 3, тора не хватает он гемагглютинин и не содержит Орфс между ORF1b и ген S. Кроме того, два прогнозируемых Орф (ORF3 и ORF4) являются кодируется в области между S и E, и накладывается на большую их часть длина. ORF3 имеет последовательность IG 2 bp вверх по течению от начального кодона ATG. В отличие от других групп, атипичная пневмония содержит пять прогнозируемых Орфв в область между M и N генами. ORF7 расположен на 10 базах ниже по течению от стоп-кодона гена M, и имеет последовательность IG 155 нуклеотидов вверх по течению от стартового кодона ATG. Аналогично, ORF8 и ORF10 представляют собой право IG вверх по течению от их ATG стартовых кодонов. С другой стороны, 5' концов ORF9 и ORF11 коротко накладываются с фланкирующими генами, и для этого причина они не нуждаются в IG для активации транскрипции. ORF12 полностью накладывается с геном N и разделяет очень низкую гомологию с 22 КДА белок вируса MHV, кодируемый в соответствующей области.

[1497] несмотря на отсутствие признаков возможной локализации и функция, производная от подобия последовательности, ORF3, ORF7 и ORF8 содержат гидрофобные сегменты, предполагающие ассоциацию с мембранными структурами. В кроме того, ORF3, самый длинный среди специфических генов SARS, является единственным это кодирует для пептида содержа большое количество предсказанного Участки о-гликозилирования (таблица 11). Прогнозируемые участки N-гликозилирования имеют были идентифицированы в ORF3, ORF11 и ORF12.

[1498] два более коротких ОРФ в неструктурных областях являются SEQ ID NOS: 9965 и 9966. Изобретение включает полипептиды с такими последовательностями, а также фрагменты, варианты и т.д.

Филозетический Анализ

[1499] частота замещения в пределах 922 сохраненных оснований от роI выявлен ген одиннадцати коронавирусов из трех различных серогрупп используется в прошлом, чтобы показать, что вариативность внутри членов каждого серогруппа значительно меньше, чем между членами разных серогрупп, подтверждение ранее описанных серологических группировок. (Stephensen et Аль., Вирус Res 1999; 60(2):181-9). Мы использовали область 922 bp поля ген SARS и выровнял его с таким же фрагментом из других 12 коронавирусы. Полученное дерево показало, что вирус ОРВИ отличается из

остальных трех групп коронавирусов (рис. 20). Такой же результат получен с использованием полноразмерных аминокислотных последовательностей pol, 3CL-протеаза и хеликазы из области репликазы и тех из которых: Спайк и матричные гликопротеины из структурной области (данные отсутствуют показан). Эти данные подтвердили, что весь геном вируса атипичной пневмонии кластеры в новой группе (Группа 4) коронавируса.

[1500] чтобы получить большее разрешение для возможных эволюционных связей, мы выполнили анализ с использованием консенсусных последовательностей прогнозируемых областей белков. В частности, мы сгенерировали консенсусные последовательности S1 домен спайкового белка из группы 1 и группы 2, а затем мы сравнили их с доменом S1 Спайка SARS. Никакого консенсуса быть не может генерируется из группы 3, так как известен только спайковый белок AIBV. Интересно, что дерево построено из выравнивания SARS SI с консенсус, полученный из двух групп спайковых белков, был следующим: в отличие от этого на фиг. 20, и показал гораздо более тесные отношения между ОРВИ и коронавирусами группы 2 (рис. 21А). Дальнейший анализ показано, что 19 из 20 цистеинов, присутствующих в домене SARS S 1, являются пространственно сохранена с группой 2 Последовательность консенсуса, в то время как только пять поддерживаются либо в рамках группы 1, либо в рамках группы 3 последовательности (рис. 21В). Учитывая фундаментальную роль, которую играют цистеины в свертывании белка, вполне вероятно, что домен S1 коронавирусов атипичной пневмонии и группы 2 разделяют а похожая пространственная организация.

Вариабельность сегментов между коронавирусами ОРВИ

[1501] мы сравнили последовательность FRA с четырьмя полными геномами SARS доступно в Интернете. Всего было обнаружено 30 мутаций. Девять из них эти мутации были тихими, в то время как 21 привел к замене аминокислот (Таблица 12). Внутри ORF1a, три тихие и семь продуктивных мутаций были обнаружены. В ORF1b было пять тихих и три продуктивных мутации. Одна из продуктивных мутаций была вызвана двумя нуклеотидами замены, приводящие к одному изменению аминокислоты. Всего было внесено пять изменений расположенные в спайке белка, четыре из них были продуктивными и один тихий. Две продуктивные мутации были в ORF3 и в матрице гликопротеин М. По одной продуктивной мутации было обнаружено в ORF10 и в нуклеокапсидный белок N.

[1502] общая разница между FRA и TOR2 составляла девять нуклеотиды, приводящие к двум немым мутациям и семи аминокислотам Изменения. Разница между FRA и Urbani составляет 12 нуклеотидов, которые результат-пять тихих мутаций и семь изменений анионной кислоты. Для CUNK 16 нуклеотиды были разные, пять из которых представляли собой молчаливые мутации. Для FRA а ГКУ 14 нуклеотидных изменений привело к четырем молчаливым и девяти продуктивным мутации.

Пример 2

Способ получения, инактивации и очистки цельного вируса ОРВИ с использованием MCS Хроматографическая очистка смолы с последующим градиентом плотности Ультрацентрифугирование

[1503] на клетках VERO был пассирован изолят SARS FRAI (EMBL: AY310120) которые культивировались в DMEM (Gibco: Cat № 21969-035, Лот № 3078864), Пенициллин / Strep (Gibco: Cat № 15070-063, Лот № 1120042) и 3% FCS (Gibco: Cat № 10270-106, Лот № 40F6130K) на 37.степень. С., 5% СО.SUB.2. Был использован трипсин (гибко: кот № 25300-054, серия № 3078729) для отсоединения ячеек.

[1504] для производства вируса использовали третий пассаж для инокуляции Vero клетки при моим им .о нас.0.1. Клетки инкубировали с вирусом в течение 1 ч при 37.степень. С. В среде инфекции (DMEM без PS, FCS); через 1 ч клетки промывали дважды и далее инкубировали при 37С.степень. С. за 48 ч в подарок 3% ФКС и антибиотики. Надосадочная жидкость была собранной через 48 часов после заражения (р. i.) и предварительно очищенный центрифугированием при 3000 об / мин на 4.степень. С. На 10 min.

[1505] вирус торс был инактивирован (бета.- пропиолактон (BPL) обработка (1: 2000) на 18 h на 4.степень. С., После чего 3 h на 37.степень. С. тестирование вируса на успешную инактивацию, клетки VERO инкубировали с 10 мл обработанного СУПЕРНАТАНТА БПЛ в течение 4 дней при 37.степень. С.; впоследствии супернатант был перенесен в а свежая культура клеток VERO и далее инкубируется еще 4 дня. Ячейки были проверены на цитопатический эффект (ЦПЭ).

[1506] затем было собрано 200 мл инактивированного БПЛ вируса торс осветлено с помощью фильтра размера пор 0.65.µm. m (Диаметр 47 мм) для прохождения вирусные частицы так и задерживают клеточный мусор. Блок фильтра был соединен с насос Masterflex, который выполнил последовательный расход потока 40 мл/мин.

А. этап очищения хроматографии MCS

[1507] отфильтрованную вирусную суспензию затем подвергали МКС хроматография. Колонка MCS была подготовлена следующим образом. 27 мл суспензии led до 14 мл осажденной смолы, которая была упакована с использованием Gotec Superformance Колонка (диаметр 1,0 см, высота 15,7 см, объем 12,33 мл). 1% от общего числа колонку объемом 1% раствора ацетона вводят в колонку и колонку прогоняли с потоком 100 см / ч. Значения HETP, N и A были равны затем рассчитывается как HETP: 0.056 см, N / m: 1790 и A. sub.s=1.20.

[1508] количество белков в очищенном растворе после МКС стадию хроматографии оценивали с помощью метода бицинониновой кислоты (БКА) (Интерхим) (см., например, <http://www.piercenet.com/files/bca.pdf>) и электрофорез.

[1509] SDS-PAGE был выполнен в соответствии с Laemmli, Nature (1970) 227:680-685. Образцы для SDS-страницы разбавляли до концентрации белка 77. µg / ml. различные концентрации протеина были нагружены в зависимости от используемые типы геля (10/12/15 скважин, Novex / Invitrogen): ТАБЛИЦА-US-00047 Концентрация Белка Кол-во скважин при разбавлении нагрузки протеином / скважина 10 скважин 77 .µg/мл 20. му. л 1. му. г 12 лунки 77. му. г / мл 15-20.му. л 0.75-1. му. г 15 скважин 77. му. г / мл 10.му. л 0,5. му. г

[1510] образцы для использования в уменьшении SDS-страницы были подготовлены следующим образом:: ТАБЛИЦА-US-00048 26.образец му. l или разбавленный образец + 10 .µm.l Nupage Sample Buffer (4.раз.) SDS NP0003 + 4.µm. l TCEP Bondbreaker Solution 77720 (1:2 в Миллик воде) Окончательный объем: 40. µm. l

[1511] образцы нагревали в течение 10 минут при температуре 70.степень. С. или слева по адресу комнатная температура на 1 час (выходя образцы на комнатную температуру предотвращает М-белок коронного вируса для свертывания / образования комплексов), а затем центрифугировали в течение примерно одной минуты при 14000 об / мин в течение часа. настольная центрифуга.

[1512] маркеры для использования на геле были подготовлены следующим образом. Гелевые ленты содержащ меньше чем 1 .µm.g протеинов легко были визуализированы с помощью процедура окрашивания серебра с использованием набора для окрашивания серебра Protein, Plus One Протокол Окрашивания (Pharmacia Biotech).

[1513] Вестерн-блоттинг был выполнен следующим образом. Полусухая промокательная бумага методика была использована для переноса белков из геля SDS в а нитроцеллюлозная мембрана. Перенос был выполнен с током 0,8 ма/см.отхлебывать.2 на 1 час. Поликлональное антитело кролика против вируса ОРВИ был использован для выполнения иммуно зондирования с использованием Western Breeze, Novex Хромогенный Набор Для Иммунодетекции Western Blot (Novex / Invitrogen).

[1514] хроматограмма инактивированного этапа захвата SARS MCS является изображено на фиг. 27. Чтобы оценить чистоту, MCS хроматографические фракции были проанализированы путем окрашивания серебра на NuPage 10% или 4-12% бис-Трис-гель (Novex) в пониженных условиях, нагретый на 10 минут на 70.степень. С. (ИНЖИР. 28). Фракции также были проанализированы в тех же условиях с помощью вестерн-Блот (рис. 29) оценить с помощью PAK 11/03 SARS Cov 270603 нейтрализующий титр 1: 512 (это антитело было использовано для этого и последующего вестерн-блот). Оценки чистоты

являются следующими: ТАБЛИЦА-US-00049 Объем/ [Белок]/ Общий Белок / Стадия Восстановления Образец мл. МЮ. г/мл мг белка/% Урожай Короны 100 2547.6 254.76 100 После 100 2440.3 244.03 95.8 Фильтрация = Загрузка Поток Через 85 2321.4 197.32 77.5 Мышь 49.32 468.5 23.11 9.1 Пик 1 12.12 252.7 3.062 1.2 Полное Спасение -- -- 464.4 86.5

В. Шаг Ультрацентрифугирования Градиента Плотности

[1515] затем элюированную вирусную фракцию торс подвергли плотности градиентное ультрацентрифугирование с качающимся ковшовым ротором для дальнейшего очистите инактивированный вирус. 3 мл пиковой фракции MCS были загружены на линейный градиент (15-60% сахарозы; 17 мл 15% и 17 мл 60% сахарозы в градиентный микшер). Разделение было выполнено с помощью Ротора Beckman SW 28 при 20 000 об / мин в течение 2 часов.

[1516] содержание сахарозы и белка в линейном градиенте плотности фракции ультрацентрифугирования представлены в следующей таблице: график на фиг. 30 и оценка чистоты на фиг. 31: ТАБЛИЦА-США-00050 Фракция размер фракции / мл [сахароза] / % [белок]/. $\mu\text{g} / \text{ml}$ 1 2 61 96.12 2 2 59.4 98.62 3 2 57.5 87.63 4 2 54.5 86.91 5 2 50.5 79.9 6 2 47.2 74.3 7 2 43.7 68.05 8 2 40.2 60.43 9 2 37.2 57.38 10 2 34 53.12 11 2 30 50.63 12 2 25.7 35.02 13 2 22.4 35.33 14 2 19.5 39.25 15 2 15.5 69.79 16 2 8.5 169.03 17 2 8.5 128.96

[1517] концентрация белка фракции 11 (рис. 31 SDS-gel) был измеренный снова против стандартной кривой подготовленной в 30% сахарозе и руководстве до концентрации белка 3,67. МЮ. г / мл (0,05 .МЮ.г на гель). То Белок М, по-видимому, отсутствует в этом препарате, возможно, из-за процедура обработки образцов (нагретые образцы).

[1518] возможны расхождения в концентрации белка измерения в таблице 2 из-за взаимодействия сахарозы с этим анализом.

Пример 3

Способ получения, инактивации и очистки цельного вируса ОРВИ с использованием MCS Хроматографическая очистка смолы с последующим градиентом плотности Ультрацентрифугирование

[1519] инактивированный вирус торс был подготовлен, как описано в примере выше.

А. этап очищения хроматографии MCS

[1520] в этом примере было собрано 200 мл инактивированного вируса торс подвергнут МКС-хроматографии. Хроматограмма шага захвата инактивированная очистка вируса ОРВИ с помощью МКС показана на фиг. 32, то восстановление белка в следующей таблице и оценка чистоты в ИНЖИР. 33: ТАБЛИЦА-US-00051 Объем/ [Белок]/ Общий Белок / Стадия Восстановления Образец мл. МЮ. г/мл мг белка/% Корона 200 2239.2 447.83 100 Сбор Вирусов После 200 2245.1 449.02 100.3 Фильтрация = Загрузка Подача Через 185 2126.3 393.37 87.8 Мышь 49.32 450.1 22.2 5.0 Пик 1 4.43 1245.6 5.52 1.2 Общее Восстановление -- 421.08 93.7

Степень Ультрацентрифугирования Градиента Плотности

[1521] затем 3,5 мл пиковой фракции MCS были загружены на линейную градиент (15-40% сахарозы: 16 мл 15% и 16 мл 40% сахарозы в градиенте смеситель). Разделение было выполнено с помощью Ротора Beckman SW 28 при 20,000 об / мин на 2 часа.

[1522] содержание сахарозы и белка в линейном градиенте плотности фракции ультрацентрифугирования представлены в следующей таблице и график на фиг. 34: ТАБЛИЦА-US-00052 Размер фракции трубки/мл [сахароза] / % [белок]/. $\mu\text{g} / \text{ml}$ 1 2 40 45.86 2 2 39 45.68 3 2 37.5 44.14 4 2 35.5 37.82 5 2 33.5 34.48 6 2 31.5 31.76 7 2 30.5 29.49 8 2 28 30.87 9 2 25.5 31.7 10 2 23.5 26.74 11 2 21.75 23.58 12 2 20 35.33 13 2 18 96.38 14 2 14.5 523.79 15 2 8 941.97 16 2 8 696.7

[1523] восстановление белка показано в следующей таблице и оценка чистоты показана на фиг. 35. Электронная микрофотография фотографии градиент плотности фракций 8, 9 и 10 приведены на фиг. 36: ТАБЛИЦА-US-00053 Протеин / Полный Шаг Шаг объем/мл. МЮ .г / мл белка / мг белка % Нагрузка 3,5 мл 1245,6 4359,6 100 Массовая доля белка 3,5 мл 720,8 4324,9 99,2 Вирусная Пиковая фракция 8 мл 29,7 237,6 5,5 Общее Восстановление 4562,5 104,7

Пример 4

Иммунизация мышей инактивированным вирусом ОРВИ

[1524] мышей иммунизировали подкожно на 0, 14 и 28-е сутки с 5 . μg BPL-инактивированные частицы SARS-CoV (BPL-SARS-CoV), либо самостоятельно, либо вместе с квасцами или MF59 в качестве адъювантов. Сыворотку собирали на 0-е сутки (предварительная иммунизация), 13 (после 1-й иммунизации), 28 (после 2-й) и 35 (1 неделя после 3-й иммунизации). Были оценены нейтрализующие антитела для блокирование атипичной инфекции клеток Vero in vitro. Через 3 года иммунизации, титры нейтрализации находились в диапазоне 1: 100-1: 1000, которые уровни подобные к тем присутствующим в сыворотке SARS выздоравливающие пациенты. Как показано в следующей таблице, антиадъювантная вакцина индуцировала нейтрализующее антитело после третьего случая иммунизация, и эффективность этой вакцины была значительно увеличена мимо включая адъюванты, с нейтрализующим антителом, появляющимся после этого 2-я иммунизация и общее увеличение титров после этого 3-го иммунизация: ТАБЛИЦА-США-00054 Титр Нейтрализации Иммуноген пре пост 1-й пост 2-й пост 3-й BPL-SARS-CoV + MF59 (5 . μg) <1: 20 BPL-SARS-CoV + квасцы (5 . μg) <1: 20 BPL-SARS-CoV (5 . μg) <1:20 <1:20 PBS <1:20 <1:20 <1:20

Пример 5

Иммунизация Balb / c Mouse инактивированным вирусом ОРВИ

[1525] разработана модель мыши Balb / c для заражения ОРВИ (Subbarao et al. (2004), J. Virol., 78:3572-77. В этой модели, Balb/c мышей прививают интраназально с 10.отхлебывать.4 TCID.SUB.50 от вируса. Около 48 часов после прививки, увеличение TCID в 2 раза.SUB.50 вирус титр может быть обнаружен в легких инфицированных мышей. В то время как вирус репликация охотно обнаружена, мыши не показывает никакое заболевание SARS симптомы и самопроизвольно очищают вирус через неделю после прививки. Один снижение титра вируса у ранее иммунизированных животных по сравнению с контрольные животные демонстрируют защитный эффект от применения вакцины оцененный.

[1526] в этом примере четыре мыши Balb/c в группе иммунизированы тремя раз с 5 . μg BPL инактивированный SARS-CoV (дни 0, 14, 28) либо самостоятельно или в сочетании с MF59 и оспаривается с 10.отхлебывать.4 TCID.SUB.50 из них Атипичная пневмония на 43-й день. Через два дня после вызова мышам бросил вызов мышам # заражен / значит (.+- SE) # инфицированный / средний (.+- ЮВ) Иммуноген # тестируемый титр вируса # тестируемый титр вируса PBS 4/4 6.3 .+- . 0.3 3/4 2.8 .+- . 0.35 Только МФ-59 4/4 6.1 .+- . 0.13 3/4 3.0 .+- . 0.38 Вакцина против гриппа (5 . μg) 4/4 6.3 .+- . 0.07 3/4 2.9 .+- . 0.36 Вакцина против гриппа (5 . μg) + MF-59 4/4 6.0 .+- . 0.19 4/4 3.0 .+- . 0.11 BPL-SARS-CoV (5 . μg) 1/4 1.6 .+- . 0.13* 0/4 не обнаружено** BPL-SARS-CoV (5 . μg) + MF-59 0/4 не обнаружено* 0/4 не обнаружено** Двуххвостый Т-тест Стьюдента, по сравнению с PBS-иммунизированными мышами, показал: *P **P = 0,025

[1527] как показано, вирус не может быть обнаружен в BPL-SARS-CoV иммунизированная мышь. Нижний предел обнаружения инфекционного вируса в

10 случаях% ж / в суспензия гомогената легких составляла 1,5 лог.SUB.10TCID.SUB.50/gm, и в 5% w/v суспензии носовых турбин предел составлял 1,8 бревно.SUB.10TCID.SUB.50/GM. Вирусные титры у иммунизированных млекопитающих были такими ниже этих пороговых значений.

[1528] таким образом, инактивированная вакцина SARS-CoV была очень эффективна при предотвращая вирусную инфекцию, так как только одна из восьми мышей иммунизирована вакцина, как с адьювантом MF59, так и без него, была инфицирована. Похожая защита не наблюдалась в контрольных группах разбавителя PBS, MF59 адьювантная, или вакцина против вируса гриппа с адьювантом или без него.

[1529] нейтрализующие титры сывороток, взятых у животных в эксперименте исследование challenge было оценено через две недели после 1-го, через одну неделю после 2-го, и одна неделя после 3-й иммунизации. Мыши, иммунизированные с помощью вакцины с Адьювант MF59 уже разработал титр нейтрализации 1:71 после того, как 2-я иммунизация, которая увеличилась до 1:588 после 3-й иммунизация, в то время как мыши, получающие неадьювантную вакцину, не делали этого имеют какую-либо нейтрализующую активность после 2-го и нейтрализующего титра 1: 64 пост-3-я иммунизации. Сыворотки крови мышей в каждой из контрольных групп не проявил никакой нейтрализующей активности. Эти данные наглядно демонстрируют: не только способность инактивированной вакцины против ОРВИ-ков индуцировать защитные уровни атипичных антител нейтрализующих, но и полезных эффект формулирования вакцины с адьювантом для повышенных доз титры нейтрализации.

Пример 6

Препарат ОМВ, содержащий вирусные антигены ОРВИ

[1530] E. coli были трансфицированы с помощью представляющей интерес плазмиды (кодирующей а Вирусный антиген ОРВИ). Одиночные колонии, укрывающие интересующую нас плазмиду были выращены за ночь в 37 лет.степень. С. В 20 мл LB / Amp (100. mu. g / ml) жидкая культура. Бактерии были разбавлены 1: 30 в 1,0 л свежей среды и выращивали в любом из 30 лет.степень. С. или 37.степень. С. вплоть до передозировки.SUB.550 доходило до 0,6-0,8. Экспрессия рекомбинантного белка была индуцирована с помощью IPTG при конечной концентрации 1,0 мм. после инкубации в течение 3 часов, бактерии были собраны центрифугированием при температуре 8 000.раз.г в течение 15 минут в 4 года.степень. С. И ресуспендированный в 20 МЛ 20 мм Трис-ХКЛ (ПЭ-аш 7.5) и полные ингибиторы протеаз (Boehringer-Mannheim.ТМ.). все последующие процедуры были выполнены в 4 часа.степень. С. или на льду.

[1531] клетки были нарушены путем озвучивания с помощью Соникатора Брэнсона 450 и центрифугировали на 5 000.раз.г в течение 20 мин осаждают неповрежденные клетки и органы включения. Супернатант, содержащий мембраны и клетки мусор центрифугировали при 50000 g (Beckman Ti50, 29 000 об / мин) в течение 75 мин., промывают 20 мм бис-Трис пропаном (рН 6,5), 1,0 м NaCl, 10% (в/в) глицерин и снова осаждают при 50000 g в течение 75 минут. Гранула была ... ресуспендирован в 20 мм Трис-НСl (рН 7,5), 2,0% (v/v) Саркозил, в комплекте ингибитор протеазы (1,0 мм ЭДТА, конечная концентрация) и инкубировали для 20 минут для того чтобы растворить внутреннюю мембрану. Клеточные обломки были гранулированы путем центрифугирование при 5000 g в течение 10 мин и супернатант центрифугировали при 75000 г на 75 минут (Beckman Ti50, 33000 об / мин). Везикулы наружной мембраны промывали 20 мм Трис-НСl (рН 7,5) и центрифугировали при 75 000.раз.г в течение 75 минут или на ночь. ОМВ был, наконец, реанимирован в 500. МЮ. л 20 мм Трис-НСl (рН 7,5), 10% v/v глицерина. Белок концентрация была оценена стандартным анализом Брэдфорда (био-рад), пока концентрацию белка фракции внутренней мембраны определяли по формуле: Анализ протеина DC (Bio-Rad). Различные фракции из изоляции процедура была проанализирована SDS-PAGE.

Пример 7

Иммуногенность, доза и маршрут-график рекомбинантного спайкового белка in Мыши

[1532] иммуногенность, путь и дозировка рекомбинантного Спайка белки изобретения у мышей могут быть оценены с помощью следующих методов подробный протокол. Предпочтительно, введенный антиген будет вызывать нейтрализующие титры антител, по крайней мере, в диапазоне 1/100 - 1/1000. Увеличивая дозы антигена можно испытать в границах от 5 до 20. му. г рекомбинантного антигена шипа самостоятельно или смешанного с равным объемом MF59-цитрат, вводимый СК или им обезболиваемым мышам в 100 .му.л из прививочный материал. Группы мышей BALB/c, 6 в обработке воспламенены на дне 0 и повышен в день 14 и 28. ТАБЛИЦА-США-00056 Групповое лечение доза / маршрут интервал отбора проб количество мышей 1-3 REC-спайковый белок 20, 10, 5. mu. g/SC 7, 21, 35, 42 d 6 на уровень дозы 4-6 REC-Spike protein 20, 10, 5. mu. g / SC 7 6 на уровень дозы 7-9 REC-Spike protein 20, 10, 5. mu. g / IM 7, 21, 35, 42 d 6 на уровень дозы 10-12 REC-Spike protein 20, 10, 5. mu. g / IM 7 6 на уровень дозы 13-15 Rec-Spike-MF59 20, 10, 5. mu. g/SC 7, 21, 35, 42 d 6 в уровень дозы 16-18 Rec-Spike-MF59 20, 10, 5. mu. g / SC 7 6 в уровень дозы 19-21 Rec-Spike-MF59 20, 10, 5. mu. g / IM 7, 21, 35, 42 d 6 в уровень дозы 22-24 Rec-Spike-MF59 20, 10, 5. mu. g / IM 7 6 в уровень дозы 25 MF59 NA/SC 7, 21, 35, 42 d 6 + 6 (sac d 7 и 42) 27 MF59 NA / IM 7, 21, 35, 42 d 6 + 6 (sac d 7 и 42) 29 физиологический раствор NA/SC 7, 21, 35, 42 d 6 + 6 (sac d 7 и 42) 31 физиологический раствор NA / IM 7, 21, 35, 42 d 6 + 6 (sac d 7 и 42)

[1533] этот протокол может также использоваться для оценки профиля Th1 / Th2 специфический иммунный ответ, вызванный рекомбинантным спайковым белком. Нейтрализующие и Спайк-специфичные титры антител будут оцениваться через несколько дней 7, 21, и 35; IgG2a против igg1 изотип Спайк-специфических антител будет определено на днях 21 и 35; пролиферация in vitro лимфы узловые и селезеночные Т-клетки против рекомбинантного спайкового белка будут определяется на 7-й и 42-й дни соответственно; IFN -гамма. а еще Ил-4 продукция селезеночной Т-клеткой против рекомбинантного спайкового белка из Атипичная пневмония будет оценена на 42-й день. Будет собрана периферическая кровь на 7-й, 21-й, 35-й дни; клетки лимфатических узлов на 7-й день и клетки селезенки на 7-й день 42. Нейтрализующие и Спайк-специфичные титры антител и их изотипы будут: определяется ингибированием атипичной инфекции клеток Vero и путем Элиза, соответственно. Пролиферация лимфатических узлов и селезеночных клеток будет определится сами .отхлебывать.3[H]-поглощение тимидина. Частоты селезенки ИНТЕРФЕРОН-гамма. а IL-4, продуцирующий Т-лимфоциты, будет определяться путем ELISPOT и FACS.

Пример 8

Иммуногенность, дозировка и график движения Спайковых белков у кроликов

[1534] иммуногенность, путь и дозировка рекомбинантного Спайка белки данного изобретения у кроликов могут быть оценены с помощью следующих критериев подробный протокол. Увеличивая дозы можно испытать в границах от 5 к 40. mu. g рекомбинантного спайкового антигена в одиночку или в смеси с равным объемом MF59-цитрат, управляемый SC или IM к анестезированным животным в 200 . му. л прививки. Группы кроликов новозеландских белых, по 10 голов лечение, будет иммунизировано, как показано в таблице 20 ниже. Животное будет загрунтован в день 0 и усилен в дни 14 и 28. Периферическая кровь будет собрана в дни 7, 21 и 35. Нейтрализуя и Спайк-специфический титры антител будут определяться путем ингибирования инфекции SARS-CoV у Клетки Vero и методом ИФА, соответственно. ТАБЛИЦА-US-00057 Групповая обработка доза / маршрут интервал отбора проб количество кроликов 1-4 полнометражный спайковый белок 40, 20, 10, 5. mu. g/SC 7, 21, 35 d 10 пер уровни доз 5-8 полнометражный спайковый белок 40, 20, 10, 5. mu. g / IM 7, 21, 35 d 10 пер уровни доз 9-12 усеченный спайковый белок 40, 20, 10, 5. mu. g/SC 7, 21, 35 d 10 пер уровни доз 13-16 усеченный спайковый белок 40, 20, 10, 5. mu. g / IM 7, 21, 35 d 10 пер уровни доз 17-20 полнометражный спайковый белок-MF59 40, 20, 10, 5. mu. g/SC 7, 21, 35 d 10 в уровень дозы 21-24 полнометражный спайковый белок-MF59 40, 20, 10, 5. mu. g / IM 7, 21, 35 d 10 в уровень дозы 25-28 усеченный спайковый белок-MF59 40, 20, 10, 5. mu. g/SC 7, 21, 35 d 10 в уровень дозы 29-32 усеченный спайковый белок-MF59 40, 20, 10, 5. mu. g / IM 7, 21, 35 d 10 в уровень дозы 33 MF59 NA / SC 7, 21, 35 d 10 34 MF59 NA / IM 7, 21, 35 d 10 35 физиологический раствор NA / SC 7, 21, 35 d 10 36 физиологический раствор NA / IM 7, 21, 35 d 10

Пример 9

Иммуногенность и график доз рекомбинантного Спайка у хорьков

[1535] иммуногенность и дозирование рекомбинантных спайковых белков у больных СД 2 типа изобретение в хорьках может быть оценено с

использованием приведенной ниже детализации протокол. Три группы хорьков, 6 для лечения, будут иммунизированы с рекомбинантным протеином шипа SARS-CoV от линий клетки CHO, самостоятельно или смешивают с равным объемом MF59-цитрата, вводят SC до обезболивали животных в 200 мл инокулята. Рекомбинантный шип белковая вакцина будет испытана в той дозе, которая является самой высокой нейтрализующие титры антител у мышей на 35-й день после второго повышения. Животные будут загрузены в день 0 и усилены в день 14 и 28. Периферическая кровь будет собираться на 7-й, 21-й и 35-й дни. Нейтрализующий а титры Спайк-специфических антител будут определяться путем ингибирования ОРВИ-ков инфекции клеток Vero и методом ИФА, соответственно. ТАБЛИЦА-США-00058 Номер Выборки Группы лечение доза / маршрут интервал хорьков 1 & 2 REC-Spike protein Y. mu. g или 2Y. mu. g/SC 7, 21, 35 d 6 3 & 4 REC-Spike protein + Y. mu. g или 2Y.mu. g/SC 7, 21, 35 d 6 MF59 5 физиологический раствор NA / SC 7, 21, 35 d 6

[1536] 3 группы хорьков, по 6 животных в каждой группе, используемые для исследования иммуногенности выше можно после этого использовать для того чтобы определить эффективность рекомбинантный спайковый белок для защиты вакцинированных животных от инфекции и / или болезнь. Anesthetized животные будут оспорены два век после того, как последний толчок внутритрахеально с 10.отхлебывать.6 срединная культура тканей инфекционный блок дозы (TCID.SUB.50) штамма SARS-CoV Юта. Инфекция к ОРВИ-ков будет оцениваться путем взятия носового, фарингеального и ректального тампонов от животных в течение 20 дней после вызова, как описано (12). Присутствие содержание торс-Ков в пробах материалов будет оцениваться методом от-ПЦР и инфекции анализ клеток Vero. Животные будут контролироваться на предмет клинических признаков ОРВИ заболевание путем оценки времени сна, температуры, респираторных симптомов, диарея, масса тела и выживаемость. Защита будет определяться законом величина и продолжительность пролития вируса, а также по продолжительности и степени тяжести симптомы заболевания и процент выживших животных.

Пример 10

Экспрессия спайкового белка для вакцинации

[1537] спайковый гликопротеин SARS-CoV был экспрессирован в обоих полнометражных образцах и усеченные формы, используя конструкции NSH и nshat pCMVIII описано выше, оба с тегами гексагистидина. Векторными конструкциями были: оценивали на экспрессию через 48 ч после трансфекции в 293 клетки и COS7 ячейки. Полноразмерный спайковый белок (nSh) был обнаружен с помощью western blot только в клеточном лизате, но не в культуральных средах (рис. 52).

[1538] было выражено большинство полноразмерного спайкового белка SARS-CoV в транзитивно-трансфецированных клетках COS7 в качестве высокомолекулярного гликопротеина который работал на 540 КДА в неотредуцирующих гелях (рис. 53). Gp540-это тепло лабильны, как показывает полная диссоциация на мономерные формы (gp170 & gp180) путем кипеть, но он был упорно к обработке DTT. Эти данные показывают, что рекомбинантный спайковый белок нековалентно связанный в гомотример (gp540). Присутствие протеина Спайка внутри гомотримерная ассоциация также была подтверждена в инактивированном, очищенном состоянии Частицы вириона SARS-CoV. Анализ белков вириона методом western blot под таким же условием используемым для характеристики рекомбинантного Спайковый белок дал практически идентичные результаты (рис. 54).

Пример 11

Обработка Спайкового Белка

[1539] для того чтобы охарактеризовать обработку протеина шипа, клетки БХК-21 были инфицированы альфавирусными частицами репликона, экспрессирующими SARS-CoV полнометражный шип. Через 6 часов после заражения анаэробом из 5 человек, инфицированных клетки мечили в течение 1 ч с помощью L - [отхлебывать.35S] метионин / цистеин и погоня продолжалась до 4 часов. Этот [отхлебывать.35S] - Меченый спайковый белок был иммунопреципитируется анти-SARS кроличьей сывороткой и переваривается Эндо-N. Как переваренные, так и непереваренные белки были проанализированы с помощью SDS-PAGE (4% полиакриламид). Как показано на фиг. 55, полнометражный протеин шипа синтезированный в качестве Эндо-N чувствительного высокоманнозного гликопротеина (gp170, an ER-форма), которая претерпевает модификацию в Эндо-N резистентный гликопротеин со сложными олигосахаридами (gp180, форма Гольджи). Превращение из переход gp170 в форму gp180 происходит в течение 2 часов (рис. 56).

Пример 12

Высокоуровневая Экспрессия Белка

[1540] для разработки системы быстрого экспрессии белковых антигенов, ДНК трансфекция 293 (эмбриональная почка человека) клеток была использована, чтобы получить миллиграмм количества рекомбинантного антигена. Наиболее распространенный метод для культивирования и трансфекция 293 клеток происходит в статических или монослойных культурах. Эти процедуры были изменены путем выполнения крупномасштабной трансфекции 293 клетки в суспензии и расширение трансфецированных клеток в суспензии культура для производства секретируемых или внутриклеточных белков. Несколько исходные опыты проводили на культурах масштаба 100 миллилитров для определения оптимальных условий, таких как количество ячеек, тип трансфецирующий реагент (Фуген 6, Липитоид или RO-1538) и соотношение ДНК для переливания реагента. Основанный на экспериментальных экспериментах, Фугене 6 было самый лучший перенося реагент.

[1541] кинетику экспрессии генов сравнивали с другими вирусными препаратами огибающие гликопротеины, а также полученные данные свидетельствуют о том, что стабильный белок пики экспрессии вокруг 72 до 96 часов пост-трансфекции, в зависимости от ген интересен, а затем значительно уменьшается впоследствии. Таким образом, используя оптимальные условия, процесс трансфекции был масштабирован от 100 мл на 4 литра. Культуру 4 литров можно использовать для быстро производить 2-10 миллиграммов белковых антигенов. Для облегчения очистки от антигенов а также максимизировать выход и восстановление очищенного белка, условия трансфекции были оптимизированы с использованием среды без сыворотки крови.

[1542] процедура объемной трансфекции была использована для выражения усеченные и полноразмерные шиповые антигены. Кинетика выражения для усеченная форма спайкового белка представлена на фиг. 56а. выражение из усеченной формы Спайка белок достиг максимума около 48 часов и был конюшня до 72 часов, поэтому культуры были сжаты на столбе 72 часов трансфекция.

[1543] собранные средства массовой информации были сконцентрированы 20X и использованы для очищения усеченный протеин шипа очень простой стратегией очищения где усеченная форма шипа была захвачена на лектине ГНА с последующим ДЕАЕ и керамическая хроматография колонки гидроксипатита. Очищенный белок анализировали на SDS-странице серебряным красителем (рис. 56B) и также западным клякса (рис. 56C). Ранние усилия были в состоянии очистить усеченную форму белок шипа с чистотой >95% и приблизительно 50% восстановления. То молекулярная масса усеченной формы спайкового белка составляет примерно 170-180 КДА.

[1544] полнометражный спайковый белок был экспрессирован в 293 клетках с использованием стратегия массовой трансфекции. Данные выражения предполагают, что, как и усеченная форма, выражение достигло максимума около 48 часов после трансфекции и оставалась стабильной до 72 часов. Однако, вопреки усеченной форме и как и ожидалось, полноразмерный белок не секретируется, а скорее сохраняется внутри ячеек, как показывает отсутствие какого-либо сигнала в западных кляксах супернатантов клеточных культур. Полнометражная форма белка была очищенные от Тритона x-100 моющие средства-экстрагированные клетки. Полнометражный шип затем белок был захвачен на лектине ГНА, а затем гидроксипатитом и SP хроматография. Рассчитанная молекулярная масса полноразмерного Спайка белок составляет примерно 600 КДА, что близко к теоретической массе для тримера.

Пример 13

Культуры семян вируса SARS

[1545] вирус эталонного семени SARS-CoV распространялся только в сертифицированном Vero клетки будут использоваться для генерации основного и рабочего вирусов Семена под GMP. Клинический образец из дыхательных путей а больной, инфицированный ОРВИ, прививается на документированную Vero клетки, с сертифицированными питательными средами. Питательная среда, содержащая вирус урожай собирают через 4 дня после заражения и назначают Пассажа 1 (P1). Один второй раунд распространения вируса снова проводится в сертифицированном VERO клетки с сертифицированными средами, путем инокуляции по 1 мл на колбу T-75 из 100 в разы разбавленный вирус P1. Супернатант культуры был собран через 3 дня пост-инфекция и сохраненный на -80.степень. С. В качестве эталонного запаса P2 вирус, без очищения зубного налета.

[1546] клеточными банками клеток Vero для дальнейшего производства SARS-CoV являются подготовлено из определенных подмножеств ячеек, которые не использовались с момента возникновения трансмиссивных губчатых энцефалопатий (например, с 1980 года). Банк исследовательских ячеек этих ячеек был подготовлен с использованием указанных новых Телячья фетальная сыворотка бычьего происхождения из Зеландии. Из этого исследовательского банка клеток, мастер Банк клетки (МСВ) сделан под условиями GMP и использованием только определенного и хорошо контролируемые средства массовой информации и добавки. Клеточный банк будет проверен на наличие отсутствие адвентитивных агентов согласно применимым США, ЕС, и международные руководящие принципы (см. пункты для рассмотрения "характеристика клеточные линии, используемые для производства биологических препаратов", FDA / CBER 7/1993; Ich Q5D проект 6 "Клеточные субстраты", окт. 23, 1996; CPMP/ICH / 294 / 95 " Примечание для руководящих указаний по Качество биотехнологической продукции: получение и характеристика Клеточные субстраты, используемые для производства биотехнологических/биологических материалов Продукты (Шаг 4, 16. Июл. 1997); окончательный проект ВОЗ "требования к использованию клеток животных как субстратов in vitro для производства биологических препаратов" Июл. 3, 1997). Тестирование на опухоли и идентичность также требуется для это банк клеток.

[1547] эталонный вирус очищается от бляшек и расширяется в сертифицированном виде Ячейки Vero при отсутствии FCS для формирования Мастер-и рабочих данных Семена. Еще один вариант, чтобы помочь обеспечить чистоту и облегчить оценку из сохранности основного семени следует подвергать торс-Кову дражированию и реанимация в PBS. Суспензия вируса составляет до 60% (ж/ж) сахарозы с кристаллической сахарозой, перенесенной к пробке центрифуги и перекрытой с 50, 40, 30 и 20% (w/w) растворами сахарозы в PBS. Градиент есть центрифугировали в течение 72 ч, а затем фракционировали. Вирусосодержащая фракция разбавляется и вирионы повторно гранулируются путем ультрацентрифугирования. РНК от вирусная гранула выделена и трансфицирована в сертифицированные клетки Vero в результате чего " инфекционная " позитивная нить РНК приведет к получению заразного вируса, который можно бляшк-очистить и расширить к генерируете альтернативные Мастер-и рабочие семена из очищенной вирусной РНК.

[1548] вирусные семена тестируются на отсутствие адвентивных агентов (см. например, 21 CFR пересмотрен с апреля. 1, 1994, .scn.630.35 испытание на безопасность) и для идентификации, используя высокоспецифичную нейтрализующую антисыворотку, приготовленную из независимого источника. Тестирование безопасности вирусных семян для вакцины цели выполняются в плановом порядке сервисными лабораториями. ПЦР широкого спектра действия тестирование может использоваться в качестве дополнения и / или Альтернативы для тестирования.

Пример 14

Увеличение масштабов производства и инактивации вирусов

[1549] протокол по производству, инактивации и очистке инактивированный SARS-CoV с достаточной структурной целостностью для извлечения защитные нейтрализующие антитела реакции в моделях животных включают:: Клетки Vero инфицируются вирусом при М. О. I. 0,01 в отсутствие FCS и антибиотики; питательная среда собрана, очищена путем центрифугирование, и инактивированный с БПЛ, следовать конфирматором тестирование на полную инактивацию; инактивированный материал фильтруется, подвергают очистке MCS-колонн, а затем очищают сахарозой градиентное центрифугирование.

[1550] можно разработать несколько модификаций и улучшений, когда адаптация этого базового протокола в более крупном масштабе для коммерческого использования. Во первых, культуру клетки и процесс инфекции можно приспособиться к ролику бутылки, как промежуточный этап для того чтобы позволить быстрой продукции для предварительные испытания в рамках существующих установок BSL 3+. Полная реклама производство будет обычно использовать процесс ферментации в закрытой системе, но система бутылки ролика можно достигнуть более быстро. Ролик бутылки предлагают истинную систему культуры подвеса для клеток Vero, которая дает различные преимущества технических и безопасности над культурами microcarrier. Суспензионные культуры можно выращивать в любых желаемых масштабах ферментации без мешать с закрытой системой между проходами клетки, как никакое требуется трипсинизация.

[1551] для того чтобы вычислить по масштабу вверх процесс инфекции в бутылках ролика до 30-50 литры за партию, оптимальные М. О. I. И периоды сбора урожая для выбранных в первую очередь необходимо определить условия для развития средств массовой информации и культуры. Для больших шкала, способы сбора и обработки больших объемов высоконагруженной продукции заразных материал безопасно должен быть использован, и так разъединение клетки через центрифугирование должно быть заменено таким методом, как фильтрация через одноразовые фильтрующие картриджи.

[1552] MCS-хроматография и ступени градиентной очистки описанное выше можно легко масштабировать до пакетного объема до 50 литры. Для более больших томов, однако, и для увеличенной очищенности, будут использованы ультрафильтрационные и стерильные ступени фильтрации. Нуклеаза лечение для удаления ДНК клетки-хозяина также будет включено.

Пример 15

Крупномасштабные Аналитические Методы

[1553] аналитические методы для коронавируса торс включают вирус методы титрования, иммунологические и физико-химические методы к количественное определение и характеристика очищенного антигена (ELISA, PAGE, western кляк используя специфическую антисеру против очищенного всего вируса, ЕТК.). Прочее аналитические испытания включают: быстрое испытание выхода через несимметричную подачу поля разъединение и обнаружение и подсчитывать частицы лазера; Западное пятно используя специфическая антисера против индивидуальных вирусных белков; и тесты для остаточная ДНК клетки-хозяина.

[1554] остаточное тестирование ДНК обычно проводится путем гибридизации, например с использованием предельный тест. Такое тестирование проводится уже по методикам установлено и утверждено для других линий клетки. В качестве альтернативы, the Threshold.TM. метод может быть использован.

[1555] для получения специфических антител, экспрессия рекомбинантных белков из всех Орфов из структурных и неструктурных областей генов используется SARS-CoV. Орфы могут быть клонированы и выражены в E. coli и, при необходимости, также в эукариотических векторах, таких как бакуловирус. Этот может обеспечить достаточное количество очищенного растворимого белка для иммунизации мыши и кролики для получения поликлональных и моноклональных антител против Атипичные белки и настроить конкретные анализы ELISA. Различное выражение векторы можно испытать для того чтобы увеличить выход рекомбинантного протеина в а растворимая форма, например, различные векторы, один из которых содержит последовательности, кодирующие для шесть N-концевых остатков гистидина и еще один, содержащий а Глутатион-s-трансферазный белок, слитый с С-концом атипичной пневмонии белок. Рекомбинантные протеины могут быть очищены одноступенчатой колонкой хроматография на любом Никеле хелатируя Сефарозу или Смолла глутатион-Сефарозы 4В. Эти процедуры проходят очень быстро и вообще произведете протеин очищенности 60-90%, которая соответствующа для поднимать специфическая антисера (Пицца и др. (2000) Science 287: 1816-20). Пять мышей и два кролика для каждого рекомбинантного белка могут быть иммунизированы SC с 20 и 50.µg рекомбинантный белок, соответственно, данный В ИФА в качестве адьюванта, в день 0, 14 и 28. Сыворотки собираются на 7-й, 21-й и 35-й день для оценки специфические титры перед эвтаназией животных для забора крови и удаление селезенки.

[1556] для обнаружения примесей (например, белков, полученных из клеток Vero) в вакцинном препарате кроличья сыворотка реактивна против Vero-

производных белки могут быть использованы. Такие антисыворотки получают путем иммунизации кроликов С по крайней мере 10 . μ g лизата клетки Vero с CFA/IFA. Сыворотка может быть проверено на реактивность против Vero-производных белков в западных кляксах. Для получения более специфической антисыворотки против конкретной релевантной клетки-производной белки, которые, как правило, совместно очищаются с вирусом, имитируют инфицированную клетку урожаем культур, прошедших процесс очищения, может быть готовят и используют для иммунизации кроликов.

[1557] методы определения титров нейтрализации сывороток из иммунизированных животных и люди могут быть развиты, без ограничений использования инфекционный ОРВИ-Ков в лаборатории BSL-3+. Одна из таких стратегий будет заключаться в том, чтобы использование рекомбинантных антигенов, в частности спайкового белка или спайкового производного эпитопы, а также разработать анализы ELISA для измерения антител против них самих белок-мишень. Соответствующие эпитопы позволяют корреляции быть установлено между значениями ИФА и анализом на нейтрализацию вирусов ценности. Такой подход обеспечивает более быструю и эффективную работу (высок-объем) сравнение специфического и защитного антитела титры. Этот тест ELISA также является идеальным инструментом для мониторинга конкретных антитела в испытаниях безопасности, где несколько сотен сывороток животных должны быть проверенный.

[1558] еще одна стратегия заключается в объединении структурных элементов из обоих патогенный ОРВИ-ков и непатогенный коронавирусный гепатит мыши вирус (MHV) для того чтобы построить химерные вирусоподобные частицы (VLPs) которые могут быть маркированный. Анализ основан на слиянии между октадецил родамином (R18) - меченые VLPs (Hoekstra et al. (1984) Biochimica 23:5675-81). Метод основан на рельефе флуоресценции самозащитное R18, включенного в СБИС при слиянии с сетовой связью слизистые. Были показаны, что передразнивают коронавирус VLPs родные вирионы с уважение к их внешнему виду в электронном микроскопе (ЭМ) и их биологическая активность. Поскольку они не содержат вирусной РНК, однако, то они не могут вызвать продуктивной инфекции (Веннема и др. (1996) EMBO J 15:2020-2028). Систему VLP можно использовать для вируса гепатита мыши (MHV) штамм A59 (MHV-A59) Годеке и др. (2000) J Virol 74:1566-15) содержит химерный белок S. Белковая химера, состоящая из эктодомен атипичной пневмонии и трансмембранный эндодомен (64 Выпарки аминокислоты к-терминала) от протеина шипа Mxv, могут быть коэкспрессируется с белком MHV М (мембрана) и Е (оболочка) в OST-7 клетки Годеке и др.). VLPs сделанные секретным в супернатанте сжаты, очищен и мечен октадецил родамином (R18) (Hoekstra et al). Один постоянное количество Vlp инкубируют с последовательным разведением сывороток при 37.степень. С. На 1 час в 96-луночной плите. Впоследствии, клетки экспрессия рецептора для SARS-CoV, ангиотензинпревращающего фермента фермент 2 (ACE2) (Li et al. (2003) природа 426:450-54) была добавлена и степень слияния можно измерить с помощью флуоресцентного спектрофотометра.

[1559] окончательная стратегия мониторинга способности сывороток к ингибированию взаимодействие слияния клеток-клеток между клетками, экспрессирующими SARS-CoV S белок и линия клеток человека, экспрессирующей ангиотензинпревращающий фактор фермент 2 (ACE2), функциональный рецептор для атипичной пневмонии (Li et al.). Этот анализ на основе репортерных генов использует флуоресцентный сдвиг (зеленый к синему) фторуглеродный субстрат CCF2/AM (AM=ацетоксиметил) при расщеплении по .бета.- лактамаза (Bla) как отсчет для срабатывания клетк-клетки (Zlokarnik et al. (1998) Science 279: 84-88). Для этого анализа, линия клетки ВНК-производная, стабильно экспрессирующий Bla и SARS-CoV s белок генерируется. В кроме того, используется линия клеток человека, экспрессирующая ACE2 на своей поверхности. ВНК клетки, экспрессирующие белок S на своей поверхности и Bla в своем цитозоле инкубируют с серийными разведениями сывороток, подлежащих испытанию в течение 1 ч при 37.степень. С. линия клетки выражая ACE2 нагружена с 1 . μ г М CCF2 / AM в течение 1 ч при 22.степень. С., помытый дважды с PBS, и совместно культивируется с клетками ВНК. В случае слияния клеток-клеток, Bla расщепляет подложку, в результате чего происходит зеленый синий сдвиг с возбуждением При 409 Нм. Ингибирование синтеза сывороток, таким образом, обеспечивает обнаруживаемое изменение.

Пример 16

Стабилизация инактивированного SARS-CoV

[1560] хотя очищенная инактивированная вакцина SARS-CoV способна наводящ мощные нейтрализуя реакции антитела в животных, оно относительно неустойчивый и может извлекать пользу из образования увеличит стабильность в течение приемлемого периода времени. Соответствующие изменения формулировки включают пользу различных систем буфера, рядов ПЭ-аш, стабилизируя вспомогательные вещества (например, сахара и сахарные спирты, аминокислоты и др.) прием.. Испытание стабильности можно дирижировать в реальное время на нормальном хранении температуры, или сможете быть дирижировано в ускоренном темпе путем использование повышенные температуры. Таким образом, стабильность вакцины может быть повышена до примерно на один год или дольше. Лиофилизированная вакцинная композиция может также используйте для того чтобы расширить срок годности при хранении, по возможности с более дополнительными добавками для стабильности при лиофилизации.

Пример 17

Оптимизация дозы и графика приема инактивированного вируса

[1561] были сообщены животные модели инфекции торс-ков, включая мыши, хорьки и макаки. Как упоминалось в Примере 4 выше, мыши иммунизированные вакциной БПЛ-ОРВИ-ков достигают нейтрализующего антитела титры в диапазоне 1: 100-1: 1000, аналогичные уровням, найденным в выздоравливающие пациенты, и 100% защищенное от инфекции с а вызов вируса. В то время как мышь вызов модели ограничивается только инфекция но не болезнь, хорьки и макаки являются полезными моделями у человека ОРВИ заболевание. Через два-четыре дня после прививки от ОРВИ, как хорьки, так и макаки были обнаружены, чтобы пролить инфекционный SARS-CoV частицы из горла, носа и глотки, как показано в РТ-ПЦР и / или изоляция вирусов на клетках Vero. Примерно в то же время, эти зараженные животные впадают в летаргию, проявляли дыхательные расстройства и в конце концов умрут. Гистологически, ОРВИ-ков инфекция у этих животных ассоциируется с легочными поражениями различной степени тяжести, аналогичными таковым обнаружен в биоптате легочной ткани и аутопсийном материале от больных ОРВИ. При наличии этих моделей проводятся доклинические исследования с использованием вакцин сможете быть выполнено первоначально в мышах для отсчетов иммуногенности, пока эффективность оптимальных доз и графиков можно оценить у хорька и макаки-модели.

[1562] начальные исследования на мышах используются для определения оптимальной дозы и расписание, необходимое для получения наиболее высоких уровней нейтрализующего антитела, с титрами по крайней мере в диапазоне 1/100 - 1/1000. В параллельном к оценка нейтрализующей активности, других особенностей гуморального иммунитета ответ и клеточные иммунные реакции могут быть исследованы. В частности сыворотки от иммунизированных мышей можно определить для изотипа (IgG1 против IgG2a) Спайк-специфического ответа антитела. Кроме того, частоты селезенки CD4+ Т-клетки, продуцирующие IFN-гамма. а Ил-4 в ответ на БПЛА-торс-ков частицы будут оценены ELISPOT и ELISA. Эти эксперименты могут обеспечить проницаемость в качестве реакции Т-клетки помогаая прайминг защитного ответа антитела.

[1563] увеличение доз вакцины может быть проверено (например, от 5 до 20 . μ g из BPL-SARS-CoV отдельно или смешанный с равным объемом MF59-цитрата), вводят СК обезболиваемым мышам в 100.МЮ. л инокулята. Группы в составе: Мыши BALB/c, 10 в обработке, иммунизированы, с затравкой на дне 0 и повышение на 14-й и 28-й дни. Вторичные конечные точки сравнивают кинетику развития нейтрализация против Спайк-специфических титров антител и оценка Th1 / Th2 профиль специфического иммунного ответа, и поэтому нейтрализующ и Титры Спайк-специфических антител оцениваются на 7-е, 21-е, 35-е сутки и на 2-е сутки. Через 3, 4, и 5 месяцев после затравки. Титры IgG2a и IgG1: Специфичные к спайку антитела определяются на 21, 35 и 2, 3, 4-е сутки, и через 5 месяцев после затравки. Распространение ИФН-гамма. а еще Ил-4 продукция селезеночными Т-клетками против рекомбинантного спайкового белка из ОРВИ-ков оценивают на 42-й день и в конце 5-го месяца. Периферическая кровь собирается на 7-й, 21-й, 35-й дни, а также на 2-й, 3-й, 4-й и 5-й дни через несколько месяцев после грунтовки. Селезеночные клетки будут получены на 42-й день и на конец 5-го месяца. Нейтрализующие и Спайк-специфичные титры антител и изотипы определяются по ингибированию инфицирования клеток Vero и по Элиза, соответственно. Пролиферация клеток селезенки определяется путем .отхлебывать.3[H]-поглощение тимидина. Частоты селезеночного ИФН-гамма. а еще Ил-4 производство CD4.отхлебывать.+ Т-лимфоциты определяются методом ELISPOT и FACS анализ.

[1564] основываясь на результатах мышей, вакцина BPL-SARS-CoV может быть протестирована в хорьки для индукции защитных нейтрализующих титров антител. Хорьки иммунизированы по такому же графику, как и мыши и Ат доза которая вызывает самые высокие нейтрализуя титры антитела в мышах на день 35 после второго толчка. Три группы хорьков, по 6 на каждую обработку, иммунизируют препаратом БПЛ-ОРВИ-ков, отдельно или в

смеси с равным объемом MF59-цитрат, вводимый СК обезболиваемым животным в количестве 200 .мкл из прививочный материал. Животные заражаются на 0-й день и усиливаются на 14-й и 28-й дни. Периферическая кровь собирается на 7-й, 21-й и 35-й дни. Нейтрализация и Титры Спайк-специфических антител определяются путем ингибирования атипичной пневмонии инфицирование клеток Vero и методом ИФА, соответственно. Каждая группа хорьков используется для оценки эффективности препарата БПЛ-ОРВИ-Ков в защите привитых животные от инфекции и / или болезни. Обезболивающие животные находят бросил вызов интратрахеально, через две недели после последнего толчка, с 10.отхлебывать.6 медианная культура ткани инфекционные единицы дозы (TCID.SUB.50) О торс-ков Штамм CDC. Инфекцию ОРВИ-ков можно оценить, приняв назальные препараты, фарингальные и ректальные мазки от животных в течение 20 дней после вызова (Martina et al. выше). Присутствие SARS-CoV в материалах образца может оценивать методом РТ-ПЦР и инфекционного анализа клеток Vero. Животные могут быть мониторинг клинических признаков заболевания ОРВИ путем оценки времени сна, температура, респираторные симптомы, диарея, масса тела и выживаемость. Защита может определяться величиной и длительностью действия вируса линька, по длительности и выраженности симптомов заболевания, а также в процентах о выживших животных. Состав, обладающий наибольшей нейтрализующей активностью титры антител на 35-й день можно затем протестировать против двухкратного повышения доза БПЛ-Сарс-ков дана в той же рецептуре в том же режиме.

[1565] дополнительные исследования позволяют оценить иммуногенность и эффективность кандидатная вакцина у нечеловеческих приматов. Три группы взрослых киномогусов макаки, 4 в обработке, иммунизированы с BPL-SARS-CoV, самостоятельно или смешивают с равным объемом MF59-цитрата, вводят SC до обезболивали животных в 500. МЮ. л инокулята. Вакцина против ОРВИ-ОРВИ-ков может быть протестирован в дозе, вызывающей самое высокое нейтрализующие антитело титры у хорьков на 35-й день после второго повышения. А вот животные есть грунтвали на 0-й день и усиливали через 3 и 6 недель. Периферическая кровь есть собранные в течение недель 1, 4 и 7. Вторичная конечная точка должна оценить Th1 / Th2 профиль специфического иммунного ответа. Нейтрализация и Спайк-специфичные титры антител и частоты CD4+ Т периферической крови клетки, продуцирующие IFN-гамма. Ил-4 в ответ на рекомбинантный препарат Таким образом, спайковый белок SARS-ков оценивается на 1-й, 4-й и 7-й неделях. Нейтрализующие и Спайк-специфичные титры антител могут быть определены путем ингибирования ОРВИ-ков инфекции клеток Vero и методом ИФА, соответственно. Внутриклеточное окрашивание цитокинов и анализ факса будут использоваться для количественного определения IFN-гамма- и IL-4-продуцирующий CD4.отхлебывать.+ Т-клетка. То макаки также могут быть использованы для оценки эффективности препарата БПЛ-ОРВИ при защита вакцинированных животных от инфекции и/или болезней. Обезболенный макаки могут быть оспорены через две недели после последнего повышения с 10.отхлебывать.6 средняя культура ткани инфекционная доза единица (TCID.SUB.50) О торс-ков Штамм CDC в объеме 5 мл. Несколько капель вируса также могут быть вводят на каждую из конъюнктив, по 0,5 мл в нос и затем в рот. остальное - в трахее. Заражение ОРВИ-ков можно оценить путем взятия носовые, глоточные и ректальные мазки, а также фекалии животных в течение 20 дней после вызова (Fouchier et al. (2003) Nature 423: 240). Наличие: SARS-CoV в материалах образца может быть оценено RT-PCR и инфекцией анализ клеток Vero. Животные также могут быть проверены на наличие клинических признаков Атипичная пневмония путем оценки времени сна, температуры, дыхания симптомы, диарея, вес тела и выживание. Защита может быть определяется величиной и длительностью пролития вируса, по длительности и выраженность симптомов заболевания, и по проценту выживших животных. ТАБЛИЦА-US-00059 Мыши Групповое лечение доза / маршрут интервал отбора проб количество мышей 1-3 BPL-SARS-CoV 20, 10, 5. mu. g/SC 7, 21, 35 d; 10 в уровень дозы 2, 3, 4, 5 м; 4-6 BPL-SARS-CoV 20, 10, 5. mu. g/SC 42 d 10 на уровень дозы 7-9 BPL-SARS-CoV MF59 20, 10, 5. mu. g/SC 7, 21, 35 d; 10 в уровень дозы 2, 3, 4, 5 м; 10-12 BPL-SARS-CoV MF59 20, 10, 5. mu. g/SC 42 d 10 в уровень дозы 13 MF59 NA/SC 7, 21, 35 d; 10 + 10 (принесен в жертву на 2, 3, 4, 5 м; 42 d и конец 5 м) 14 физиологический раствор NA / SC 7, 21, 35 d; 10 + 10 (принесен в жертву на 2, 3, 4, 5 м; 42 d и конец 5 м)

[1566] ТАБЛИЦА-США-00060 Хорьки Отбор проб Интервал маршрута групповой обработки нет. из хорьков 1 BPL-SARS-CoV SC 7, 21, 35 d 2 BPL-SARS-CoV-MF59 SC 7, 21, 35 d 6 3 физраствор СК 7, 21, 35 D 6

[1567] ТАБЛИЦА-US-00061 Макаки Нет. от Маршрут групповой обработки интервал отбора проб макаки 1 BPL-SARS-CoV SC 1, 4, 7 Вт 4 2 BPL-SARS-CoV-SC 1, 4, 7 Вт 4 MF59 3 физиологический раствор SC 1, 4, 7 Вт 4

Пример 18

Реакция Т-Клеток Человека

[1568] Азия прелюдия к инициализации клинических исследований на людях, the реактивность Т лимфоцитов периферической крови от здоровых доноров с различные гаплотипы HLA могут быть оценены с помощью праймеризации in vitro техника (Abrignani et al. (1990) Proc Natl Acad Sci USA 87: 6136-40). Целью настоящего исследования является получение первого указания на то, что иммунодоминантные Т-клеточные эпитопы в белках SARS-CoV. Кратко РВМСs от 20 здоровых доноров с различными гаплотипами HLA будут культивироваться в среда, содержащая 5% аутологичной сыворотки, в присутствии различных концентрация частиц SARS-BPL-CoV в диапазоне от 0,5 до 20 .mu. g/ml. экспрессия маркеров активации будет оценена после 24 и еще 48 часов. Частоты IFN-гамма.- и IL-4-производя Т лимфоциты будут оцениваться через 12 ч и через 15 дней в культуре, в наличие 100 ед/мл рекомбинантного человеческого IL-2. Активированы и цитокины продуцирующие CD4 Т лимфоциты будут отсортированы и в конечном итоге клонированы как одиночные ячейки с использованием технологий FACS. Репертуар CD4+ Т-клеток от человеческие субъекты с различным уровнем HLA будут оцениваться по пролиферации анализы CD4+ Т клеточных линий и клонов против аутологичных EBV-трансформированные клеточные линии, нагруженные 15-мерными перекрывающимися пептидами из наиболее актуален структурный и неструктурный белок ОРВИ-ков.

[1569] при переходе к фактическим испытаниям на людях, безопасность и иммунные реакции будут оценены в здоровых взрослых людях после внутримышечной иммунизации с эскалацией дозы БПЛ-инактивированная SARS-коронавирус вакцины, с MF59 адьювант включается или опущен в зависимости от доклинических данных. Три / четыре прививки будут сделаны в 0, 1, 6 месяцев в первом случае когорты, и на 0, 1, 2, 6 месяцев и 0, 2, 6 неделях во втором и третьи когорты соответственно. Испытание будет наблюдателем слепым и плацебо контролируемый. Субъекты будут рандомизированы в каждый уровень дозы. Иммунный параметры реакции, котор нужно измерить будут включать нейтрализовать сыворотки антитела, антитела ИФА и продуцирующие IFN-гамма периферической крови CD4+ Т-клетки путем внутриклеточного окрашивания цитокинами. ТАБЛИЦА-США-00062 Введение Антигена Нет. лечиться нет. выборка субъектов Групповая доза (. mu. g) субъекты по расписанию с интервалом плацебо A1 10 0, 1, 6 месяцев 18 6 0, 1, 2, 6, 7 mos A2 20 0, 1, 6 месяцев 18 6 0, 1, 2, 6, 7 mos B1 10 0, 1, 2, 6, 7 mos B2 20 0, 1, 2, 6, 7 mos C1 10 0, 2, 6 недель 18 12 0, 2, 6, 10, 30 ЗКС C2 20 0, 2, 6 недель 18 12 0, 2, 6, 10, 30 ЗКС

Пример 19

Выбор клеточных линий СНО для экспрессии спайкового белка

[1570] методы получения клетки яичника китайского хомяка (СНО) линии которые стабилизированно выражают вирусные гликопротеины габарита которые конформационно интактный, соответствующим образом гликозилированный и эффективно связывающий нейтрализующие антитела хорошо зарекомендовали себя при ВИЧ и ВГС (Сривастава и др. (2002) J Virol 76: 2835-47; Srivastava et al. (2003) J Вироль 77: 11244-259; Heile et al. (2000) J Virol 74: 6885-92). То же самое методы можно приложить к SARS-CoV, для того чтобы произвести 2 различных конюшни Клеточные линии СНОК-1, производящие либо полноразмерный, либо усеченный Спайк SARS белковая пища. Спайковые белки могут быть выражены с помощью конструкций описано здесь, но без Гекса-его метки. Эти протеины могут сравнено для их способности произвести нейтрализуя антитела внутри иммунизированных животных, а также за уровень их экспрессии в клетках СНОК-1.

[1571] вектор рСМV3, выражающий Спайк, может быть использован для вывода стабильные клеточные линии СНОК-1, содержащие усилитель/промотор ЦМВ, резистентность к ампициллину, а также слитый DHFR и ослабленный ген неомицина для цели отбора. Стабилизированные линии клетки могут произведенный используя неомицин система отбора в ячейках Чок-1. Клоны могут быть секвенированы для проверки целостность вставки, и переходные трансфекции можно выполнить использование реагента для трансфекции Транс-ЛТ1 полиамина (PanVera Corp., Madison, ИСВ.) для оценки уровня экспрессии, а также целостности экспрессированный белок методом ИФА и вестерн-Блот-анализа.

[1572] начальные ячейки СНО будут выбраны, чтобы быть свободными от TSE/BSE загрязняющие вещества и риски согласно соответствующим нормативным стандартам. Для построить клеточные линии, процедуры включают в себя трансфекцию, первичный скрининг с селективной средой,

следовать субклонированием для того чтобы убедить очищенности клетки линии. Супернатанты клеток могут быть проанализированы с помощью захвата антигена ELISA к количественно оцените уровни экспрессии на всех этапах отбора и усиления. Для полнометражного выражения шипа, клетки метанола фиксированные можно экранировать для внутренней экспрессии иммунофлуоресцентным окрашиванием с использованием кролика антитела против ОРВИ. Последовательные измерения на этапе T75-фляжки расширение может быть использовано для обеспечения стабильности уровней экспрессии. То молекулярную массу и целостность экспрессируемых белков можно проверить с помощью Страница как в нативном, так и в редуцирующем и денатурирующем состояниях, а затем путем иммунопробирования.

[1573] векторы pCMV3, экспрессирующие спайковые белки SARS-CoV в любом из них полноразмерные или усеченные формы могут быть введены в ячейки CHO-K1 с использованием реагент Транс-ЛТ-1 и неизбирательные средства массовой информации. 24-48 часов после трансфекции, в зависимости от плотности клеток, клетки разделяются в соотношении 1:5 соотношение и среда могут быть изменены на селективные среды, содержащие неомицин на 500. мк. г/мл. любая бычья сыворотка используемая в этих процедурах будет Будьте из TSE-свободных источников, которые соответствуют нормативным стандартам. С десяти до четырнадцати через несколько дней отдельные колонии могут быть подобраны и перенесены в 96 колодцев пластинки и культивируют в полной неселективной среде. Когда примерно 80% из колодцев конфлуэнт, 24 супернатанта часа могут быть экранированы мимо Спайк захват ELISA. Для начального выражения полнометражного спайкового белка, клетки могут быть зафиксированы с метанолом и экранированы иммунофлуоресцентным методом окрашивание с помощью кроличьего антитела против ОРВИ. После низкоэкспрессирующей клетки линии были исключены, и есть менее 20-30 клеточных линий, захватите ELISA и западные кляксы сможете после этого быть использовано для того чтобы определить уровень экспрессии после лизиса клеток. Часть каждой линии ячейки может быть гранулированный, взвешенный и лизированный в 1% Тритон лизисном буфере для определения уровней экспрессии. От трех до четырех клонов, производящих самые высокие уровни протеина шипа в правильных структуре и конформации можно расширить к трехлитровые биореакторы и адаптированные к низкой культуре суспензии сыворотки условия для масштабирования.

[1574] анализ Elisa захвата антигена для протеина шипа SARS может быть выполнено с использованием 96 скважинных плоскодонных плит, покрытых 250 НГ на одну скважину очищенный иммуноглобулин, полученный из сывороток кроликов, которые были иммунизированы с инактивированным вирусом ОРВИ. Добавлены образцы супернатанта или лизата и инкубировали в течение 2 часов при 37.степень. С. связанный антиген реагирует против объединили ОРВИ.отхлебывать.+ ве сыворотка или высокоаффинное моноклональное антитело либо человек или мышь против белка Спайка SARS и обнаруженный используя соответствующее видоспецифическая пероксидаза-контюгированное второе антитело. Тарелки есть разработаны с использованием субстрата TMB (Pierce, Rockford, Ill.), прочитано на а длина волны 450 Нм, а концентрация белка в пробе мл составляет производный от стандартной кривой (OD против концентрации протеина) основанной на последовательные разведения известной концентрации рекомбинантного спайкового белка.

[1575] иммунопробирующий анализ также будет выполнен по следующей схеме: стандартные методы, описанные Шриваставой и др. (2002) выше. Кратко, 10-20. мк. l образца проанализировано на странице 4-20% SDS под не-уменьшение / денатурируя условия с слабым топлением. Белки есть затем переносят на нитроцеллюлозные мембраны и реагируют против поликлональная сыворотка кролика анти -- шипа, следовать конъюгированным ИГ анти -- кролика к Alexa 688 (молекулярные зонды, Oreg.). Кляксы сканируются с помощью инфракрасная система визуализации.

[1576] самые высокие экспрессирующие линии клеток-кандидатов будут экранированы для Экспрессия и стабильность спайкового белка при мелкомасштабной (3 литровой) перфузии биореакторы. Кандидатские клоны будут дополнительно оценены на уровень экспрессия, а также целостность экспрессируемого белка, и впоследствии проверено на стабильность выражения при отсутствии селекции. Выбранный вариант клоны также будут тестироваться на поддержание целостности последовательности ДНК интегрированного гена протеина шипа SARS. Чтобы быстро контролировать уровни экспрессии в небольших колбах и в трехлитровой оценке культуры, процесс на основе лектина (Gluvanthus Nivalis lectin) был получен разработан для выделения спайкового белка SARS до степени чистоты, которая позволяет полуколичественное определение и характеристика белка в супернатанте CHO. Полнометражный спайковый белок будет получен из мощного средства Triton X-100 извлеченные клетки и после этого захваченные на лектине ГНА, следовать гидроксипатит и SP хроматограф. Затем охарактеризован элюированный белок путем: (1) электрофорез полиакриламидного геля (страница) и окрашивание Coomassie, (2) иммунопробирование с анти-SARS сыворотками кролика, (3) структурное характеристизация с использованием размерной исключая хроматографии (сек), а также масс-спектрометрический анализ с использованием MALDI-TOF.

[1577] продуктивность из линии клеток CHO, экспрессирующих спайковый белок SARS должно быть по крайней мере 2 мг/л и для полнометражного белка шипа будет 3 мг / 100 г клеток, при установившейся плотности клеток. Урожайность от одного 45 дня, 2,5-литровый биореактор будет .о нас.1000 мг сырого протеина.

Пример 20

Очистка спайкового белка для вакцин человека

[1578] очистить протеин шипа SARS для производить GMP материал ранга для людской пользы, следующий основной процесс использован, с все шаги выполняются в 2-8.степень. С.: исходный материал, концентрированный супернатант культуры клеток CHO (20-30.раз.) оттаивает и фильтрованный через мембрану 0.45.мк. m; этот материал тяжело загрязненные белки из культуры, а также ДНК; первый стадия очистки-аффинная хроматография с использованием Gluvanthus Nivalis (ГНА), лектин, который предпочтительно распознает терминальную маннозу содержащие углеводы; гликозилированные белки, в том числе Спайк SARS белок захватываются и негликозилированные белки, а также ДНК, делают не привязывайтесь к этому столбцу; за столбцом ГНА следуют два хроматографические ступени работают в проточном режиме; анион обменник, ДЭАЭ, и керамический гидроксипатит (сНАР); ДЭАЭ связывает некоторое загрязняющ протеины и ДНК супернатанта, тогда как сНАР связывает любые загрязняя протеины сыворотки; полнометражный протеин шипа очищен от клеточные гранулы; клетки лизируются Тритонем x-100 и полнометражными Спайковый белок затем захватывается на лектине ГНА, а затем гидроксипатитом и SP-хроматография.

[1579] очищенный шип SARS можно более далее обработать для того чтобы извлечь адвентиционные вирусы: вирусная инактивация при pH 3,5 в течение 1 часа; образец затем концентрируется и диалфильтруется в буфер при pH 4 и, наконец, захваченный очищенный протеин используя смолау SP; протеин шипа связывает к эта смола и многие вирусы протекают через нее.

[1580] протеин шипа элюирован, сконцентрирован и диалфильтрован в рецептурный буфер. Этот сформулированный Навальный продукт после этого фильтрован до конца мембрана удаления вируса DV50 следовать фильтрацией через 0.2. мк. m мембрана. Сформулированное большое часть заполнено в соответствующие контейнеры например во флаконы по 3,0 мл, в капот с ламинарным потоком класса 100.

[1581] в процессе испытаний на каждой стадии очистки включает в себя: концентрация белка, эндотоксин (LAL), биобурден и восстановление.

[1582] до людской администрации, испытание для мощи оценит специфическая способность вакцины в тесте in vitro или in vivo к произведите эффект заданной реакции. Иммуногенность in vivo будет определяться путем дозируя группы в составе 10 мышей с различными дозами антигена протеина. Sera будет проведен анализ на наличие IgG антител с помощью ИФА. То критерий прохождения будет основан на количестве обработанных вакцинами животные, которые серопозитивны по сравнению с эталонным стандартом. Прочее тесты включают общую безопасность, стерильность, чистоту, идентичность вакцины (используя специфический ELISA для протеина Спайка), и количество & протеин концентрация (ультрафиолетовая спектрофотометрическая процедура поглощения основанная на молярная абсорбция ароматических аминокислот).

[1583] испытание Стабильности будет выполнено на Навальном веществе снадобья и на конечном продукте контейнера. Навальный продукт будет оценен на температура воздуха -60.степень. С. (порекомендованное условие хранения), 25.+-.2.степень. С. и 40.+-.2.степень. С. защищенный от света, во время баллы 0, 3, 6, 9, 12 месяцев. Конечный продукт контейнера будет испытан при температуре -60 ° С.степень. С., и перевернутый на 5.+-.3.степень. С., 25.+-.2.степень. С., и 40.+-.2.степень. С. В моменты времени 0, 3, 6, 9, 12 месяцев назад. Стабильност-показывая assays может включить возникновение, ПЭ-аш, содержание белка, SDS-страница, исключение размера ВЭЖХ и контейнер / закрытие герметичность, выполненная на одиночных образцах пробирок большого части и трипликата окончательный материал контейнера.

[1584] очищенный таким образом белок можно оценить у мышей, кроликов и хорьков, как описано в, и на основе результатов, примеры 4, 5, Пункты 8 и 9 выше.

[1585] начальные эксперименты будут выполнены на мышках для определения оптимального доза и план-график протеина шипа GMP необходимы, что выпытали самую высокую уровни нейтрализующих антител, имеющих титры по крайней мере в диапазоне 1/100- 1/1000. Спайковый белок будет тестироваться в диапазоне от 5 до 40 . μ g, отдельно или смешанный с равным объемом MF59-цитрата, к обезболивали мышей в 100.МЮ. л инокулята. Группы мышей BALB/c, 10 Пер лечение, будет проведена иммунизация. Животные будут загрузены в день 0 и повышен на 14-й и 28-й дни. Вторичные конечные точки будут сравнивать Кинетика нейтрализации против Спайк-специфических титров антител и ее оценка Th1 / Th2 профиль специфического иммунного ответа. Нейтрализация и Титры Спайк-специфических антител будут оценены на днях 7, 21, и 35 и на 2, 3, 4, и 5 месяцев после затравки; титры IgG2a и IgG1 Спайк-специфичные антитела будут определены на днях 21 и 35, и на 2, Через 3, 4, и 5 месяцев после затравки; пролиферация и IFN-гамма. а еще Ил-4 продукция селезеночной Т-клеткой против рекомбинантного спайкового белка из Атипичная пневмония будет оцениваться на 42-й день и в конце 5-го месяца. Периферическая кровь будет собрана на 7, 21 и 35 дни и на 2, 3, 4, и через 5 месяцев после затравки; клетки селезенки на 42-е сутки и в конце 5-й месяц. Нейтрализующие и Спайк-специфичные титры антител и их изотипы будет определено ингибированием инфекции SARS-CoV клеток Vero и от Элизы, соответственно. Будет определена пролиферация клеток селезенки Автор.:отхлебывать.3[H]-поглощение тимидина. Частоты селезеночного ИФН-гамма. и Ил-4, продуцирующий CD4+ Т-лимфоциты, будет определяться методом ELISPOT и FACS анализ.

[1586] далее, оптимальный дозировать и план-график для рекомбинантного Спайка вакцина будет определяться у хорьков. Основываясь на результатах мышши, то Спайковая вакцина, обладающая самыми высокими титрами нейтрализующих антител, будет испытанный против двухкратной более высокой дозы рекомбинантного протеина шипа дали в той же формулировке. 3 группы в составе хорьки, 6 в обработку, будут быть иммунизированным SC под наркомом с 200. μ g. 1 прививки. Животное будет загрузены в день 0 и усилен в дни 14 и 28. Периферическая кровь будет собрана в дни 7, 21 и 35. Нейтрализуя и Спайк-специфический титры антител будут определяться путем ингибирования инфекции SARS-CoV клеток Vero и методом ИФА, соответственно. Похож на предыдущего хорька исследования, каждая группа животных будут использованы для того чтобы определить эффективность вакцина для защиты иммунизированных животных от инфекции и/или заболевания.

[1587] иммуногенность и эффективность кандидатной вакцины также будут оценено у нечеловеческих приматов. Три группы взрослых киномогулов макаки, 4 в обработке, будут иммунизированы с рекомбинантным SARS-CoV Спайковый белок, отдельно или в смеси с равным объемом MF59-цитрата, вводят СК обезболиваемым животным в 500. МЮ. л инокулята. То Спайковая белковая вакцина будет испытана в дозе, вызывающей самую высокую нейтрализующие титры антител у хорьков на 35-й день. А животные будут ... грунтовали на 0-й день и усиливали через 3 и 6 недель. Периферическая кровь будет собранные в течение недель 1, 4 и 7. Вторичной конечной точкой будет оценка Th1 / Th2 профиль специфического иммунного ответа, как описано выше (нейтрализующие и специфичные к Спайку титры антител, частоты CD4+ Т-клетки периферической крови, продуцирующие IFN-гамма. и Ил-4 в ответ к рекомбинантному протеину шипа, определенному На На неделях 1, 4, и 7).

[1588] наконец, фаза I человека, плацебо-контролируемая, эскалация дозы, испытания безопасности / иммуногенности будут выполнены для IM рекомбинантного Вакцина против ОРВИ с адьювантом MF59. Испытание оценит безопасность и иммунные реакции у здоровых взрослых людей после иммунизации с эскалацией вводимые дозы рекомбинантной вакцины против ОРВИ с адьювантом MF59 внутримышечно. Три / четыре прививки будут даны при 0, 1, 6 месяцы. Испытание будет наблюдателем слепым и контролируемым плацебо. Предметы будет рандомизирован в каждый уровень дозы. Параметры иммунного ответа, котор нужно быть измеренные включают антитела сыворотки нейтрализуя, антитела ИФА и периферическая кровь IFN-гамма.- продуцирование CD4+ Т-клеток внутриклеточным путем цитокиновое окрашивание: ТАБЛИЦА-US-00063 Вакцины Нет. от Антиген Нет. о субъектах введение дозы, обработанной пробой плацебо Группа (. μ g) расписание субъектов (MF59) интервал A1 50 0, 1, 6 месяцев 18 6 0, 1, 2, 6, 7 месяцы A2 100 0, 1, 6 месяцев 18 6 0, 1, 2, 6, 7 месяцы

Пример 21

Сравнение инактивированного вируса и очищенного спайкового белка

[1589] иммуногенность и эффективность инактивированной вирусвакцины и очищенный спайковый белок можно сравнить у нечеловеческих приматов. Три группы взрослых макак суномолгу, 4 для лечения, будут иммунизированы с рекомбинантным спайковым белком SARS-CoV из клеточных линий CHO или C BPL-SARS-COV, данный в дозе и препарате, обладающем наибольшей активностью нейтрализующие титры антител в предыдущем испытании иммуногенности эксперименты, вводимые СК обезболиваемым животным в объеме 500 . μ л из прививочный материал. Животные будут загрузены в день 0 и усилены в день 3 и 6 недели. Периферическая кровь будет собираться на 1, 4, 7 неделях. Вторичная обмотка конечная точка будет оценивать Th1 / Th2 профиль специфического иммунного ответа, как описано выше. ТАБЛИЦА-US-00064 Пробы Нет. от Доза группового лечения / интервал маршрута макаки 1 Rec-Spike protein + or-Y. μ g/SC 1, 4, 7 Вт 4 MF59 2 BPL-SARS-CoV + or-Y. μ g/SC 1, 4, 7 Вт 4 MF59 3 физиологический раствор NA / SC 1, 4, 7 Вт 4

Пример 22

Экспрессия в дрожжах

Дрожжи-это полезная и недорогая система экспрессии эукариот. Дрожжеспецифичные белки используются в рекомбинантном вирусе гепатита В вакцины и рекомбинантные антигены SARS также могут быть экспрессированы в дрожжах для целей вакцинации. Дрожж-выражение также удобно для способ получения антигенов для получения моноклональных и поликлональных препаратов антитела, или для пользы в серологических assayс.

[1591] нуклеокапсидный белок (N) и две его различные версии спайковый гликопротеин (ы) из штамма коронавируса SARS FRA (AY310120) были: клонированный для экспрессии в *S. cerevisiae*:

[1592] SARS N: aa 1-422 (координаты 28120-29388 AY310120 штамм)--рис. 65

[1593] Спайк SARS: aa 14-1195 (трансмембранный домен и цитоплазматический хвост удалено)--рис. 66

[1594] Спайк SARS: aa 14-662 (домен S1)

[1595] чтобы построить конструкцию S1, фрагмент XhoI-NotI приблизительно 3733 bp, кодирующего полноразмерный спайковый гликопротеин, был стартовым точка. ПЦП использовали для амплификации полноразмерного гена в двух частях: XbaI-BlnI из 2440 bp и BlnI-SalI из 1306 bp. Эти фрагменты были субклонированные в коммерческие векторы (Novagen): pT7Blue2 XbaI-BlnI (5' end Спайка гликопротеина) и pT7Blue2 Бини-Сали (3' конец Спайка гликопротеин; рис. 58), соответственно. Следующие праймеры были использованы внутри последующие реакции ПЦП: Spk-1 (5') SEQ ID NO: 9785; Spk-2 (5') SEQ ID NO: 9786; Spk-3 (5') SEQ ID NO: 9787; Spk-4 (5') SEQ ID NO: 9788.

[1596] компетентные клетки *E. coli* НВО101 были трансформированы с помощью ПЦП лигатурный продукт и нанесенные на него пластины агара Лурии, содержащие 100. МЮ. г / мл Ампициллин. Искомые клоны были идентифицированы с помощью мини-экрана ДНК анализ. После проверки последовательности и амплификации плазмиды желаемые субклоны, желательного было устранить с внутреннего сайта SalI присутствующее в части XbaI-BlnI последовательности Спайка для того чтобы облегчить будущее клонирование в вектор экспрессии дрожжей (BamHI-SalI). Поэтому мы подготовили вектор CellII-MfeI из pT7Blue2 XbaI-BlnI (5' концевой Спайк) подклон для устранения последовательности 143 bp, содержащей Сайт SalI. Киназированные олиго DSI-6 (SEQ ID NOS: 9789-9794) были затем перевязаны в вектор CellII-MfeI для замены 143 bp, которые были удалены в мутировать сайт SalI (без изменений aa), создавая pT7Blue2.XbaI-BlnI.ДЕЛЬТА.соль.

[1597] 5' XbaI-BlnI (от pT7Blue2.XbaI-BlnI .ДЕЛЬТА.Sal) и 3' BlnI-SalI (от pT7Blue2 BlnI-SalI) спайковые гликопротеиновые вставки были гель-очищенные

и перевязанные их в вектор p893-1 XbaI-SalI (вектор производный от pLitmus 38 (New England Biolabs) с Альфа-фактором последовательность лидера клонировалась в бамхи-Сали сайты MCS). То результирующая полнотражная последовательность кодирования Спайка SARS была названа p893-1.АТИПИЧНАЯ ПНЕВМОНИЯ Спайк 1255 #9 (рис. 58).

[1598] компетентные клетки *E. coli* HB 101 были трансформированы с помощью олиго заменяющее лигатурное изделие и покрытые им пластины из агара Лурии, содержащие 100. мЮ. г/мл ампициллина. Желаемые клоны были идентифицированы с помощью мини-экраный анализ ДНК. После проверки последовательности положительного клоны, pT7Blue2 Xba-млрд.ДЕЛЬТА.Sal был выбран для использования в качестве шаблона для Реакции ПЦР для усиления Спайка S1 1967 BP XBA-Sal фрагмента. То затем фрагмент был подклантирован в вектор p893-1 Xba - Sal, последовательность проверено, и названо оно p893-1.Шип S1 #11 (рис. 59).

[1599] для клонирования в вектор выражения *S. cerevisiae*, pBS24. 1, 5 ' конец последовательности S1 должен был быть изменен с XbaI на HindIII для того чтобы позволить лигатуре с концом 3 ' HindIII ADH2/GAPDH Фрагмент промотора BamHI-HindIII. От pT7Blue2 Xba-млрд.ДЕЛЬТА.Соль (описанный выше) фрагмент AgeI-SalI 1943 bp был очищен гелем. Этот фрагмент был перевязан вместе с синтетической парой HindIII-AgeI 30 bp киназированные олиго (S1-1+S1-2 создание необходимого 5 ' HindIII сайта) в коммерческий вектор субклонирования Psp72 HindIII-SalI (названный pSP72.АТИПИЧНАЯ ПНЕВМОНИЯ Шип S1 #2; фиг. 59). S1-1 имело номер удостоверения личности SEQ: 9795 и S1-2 имеет номер удостоверения личности SEQ: 9796.

[1600] после проверки последовательности положительного клона из мини-экрана Анализ ДНК, фрагмент HindIII-SalI был очищен гелем. The 1365 bp Фрагмент промотора BamHI-HindIII ADH2/GAPDH был лигирован вместе с 1973 BP hindiii-SalI S1 фрагмент в вектор pBS24. 1 BamHI-SalI создание генно-инженерной pd.SARS Spike S1 #2 выражение плазмиды (рис. 60).

[1601] штамм *S. cerevisiae* AD3 был трансформирован с помощью pd.Торс шип S1 #2 а единичные трансформанты проверялись на экспрессию после истощения глюкоза в питательной среде. Рекомбинантный протеин был выражен на максимуме уровни в дрожжах, как обнаружено окрашиванием Coomassie blue. В частности, дрожжевые клетки трансформировали плазмидой экспрессии SARS S1 с использованием The Invitrogen *S. c. EasyComp*.TM. комплект для трансформации. Выражение на рисунке на рисунке. 57.

[1602] для экспрессии белка Spike 1195, который не содержит Регион Транс-мембраны (TM) или цитоплазматический кабель который присутствуют в полнотражный конструктор SARS, следующая серия генетических манипуляций было выполнено:

[1603] из pT7Blue2 BlnI-SalI #11 (описано выше) A BlnI-DraI 1056bp фрагмент был очищен гелем. Этот фрагмент был перевязан синтетическим веществом пара 68 bp DraI-SalI kinased oligos (DRS1+2; SEQ ID NOS: 9797 & 9798) в вектор pT7Blue2 BlnI-SalI (рис. 61). Компетентные клетки *E. coli* HB101 были преобразованы с продуктом лигатуры замены олиго и покрыты на луриевых агаровых пластинках, содержащих 100.мЮ. г/мл ампициллина. Мечтания клоны были идентифицированы с помощью анализа ДНК с помощью мини-экрана. После последовательности подтверждение клон был назван pT7Blue2 bini-Sal Spike 1195 #7. To 1126 BP BlnI-SalI фрагмент, кодирующий 3 ' конец Спайка 1195 был гель очищенный (рис. 61).

[1604] для того чтобы произвести часть шипа 1195 XbaI-SalI, 3109bp Фрагмент XbaI-PciI был выделен из p893-1.Спайк SARS 1255 #9 (описано выше) и фрагмент 457bp PciI-SalI из pT7Blue2.Торс-шип 1195 #7 (описано выше). Эти два фрагмента были клонированы в p893-1 Вектор XbaI-SalI, создавая p893-1.Плазмиды Спайка 1195 #34 SARS (рис. 62).

[1605] для клонирования Спайка 1195 SARS в Pbs24. 1 *Saccharomyces cerevisiae* вектор выражения, необходимо было изменить 5 ' конец Спайк 1195 SARS от XbaI к HindIII, как сделано для Спайка S1 выражение clone описано выше. Для начала, 2416 bp AgeI-BlnI фрагмент был выделен из p893-1.Спайк торс 1195 #34. Этот фрагмент был связывается с синтетическим HindIII-AgeI 30 BP oligos (описано выше, чтобы произведите протеин S1 для выражения в *S. cerevisiae*) в вектор pT7Blue2 HindIII-BlnI. Компетентными клетками *E. coli* HB101 были: преобразованный с продуктом лигирования замены олиго и покрытый дальше Лурия агаровая пластинки, содержащие 100. мЮ. г/мл ампициллина. Нужные клоны были идентифицированы с помощью анализа ДНК miniscreen. После последовательности верификация положительного клона и плазмидная амплификация pT7Blue2.SARS 1195 5 ' HindIII-BlnI #10 (рис. 63), мы изолировали 402 bp Фрагмент HindIII-NcoI и фрагмент 2044 bp NcoI-BlnI (рис. 63). IT было необходимо, чтобы изоляция HindIII-BlnI была сделана в два этапа, чтобы избегайте проблем клонирования, связанных с внутренним сайтом HindIII, расположенным по адресу нуклеотидное число 1319 белка spike 1195.

[1606] собрать кассету выражения BamHI-SalI Спайка 1195 в вектор pBS24.1 *E. coli* hb101 компетентные клетки были трансформированы с помощью фрагмент BamHI-HindIII (промотор ADH2/GAPDH), hindiii-NcoI 402bp, NcoI-BlnI 2044 bp и bini-SalI 1126 BP фрагменты в pBS24. 1 Вектор бамхи-Сали. Образцы были нанесены на пластины агара Лурия, содержащий 100.мЮ. г/мл ампициллина. Нужный клон был идентифицирован используя анализ ДНК miniscreen, таким образом создающ genetically проектированное палладий.Острие торс 1195 #10 (рис. 64).

[1607] штамм *S. cerevisiae* AD3 был трансформирован с помощью pd.SARS Spike 1195 #10 и одиночные трансформанты были проверены на экспрессию после истощения о содержании глюкозы в среде. Рекомбинантный протеин был обнаружен мимо Окраска кумасси синяя. В частности, дрожжевые клетки были трансформированы с помощью экспрессионная плазмиды SARS 1195 с использованием Invitrogen *S. c. EasyComp*.TM-да. Комплект Для Трансформации.

Пример 23

Экспрессия в клеточных линиях млекопитающих

[1608] фрагменты днк, содержащие белок S ORF из 1255 аминокислот были амплифицированы методом от-ПЦР с вирусной РНК SARS (Франкфуртский изолят), выращенной в клетки Vero. Амплифицированные фрагменты ПЦР были клонированы в pBlueScript векторная, секвенированная и консенсусная спайковая последовательность была собрана для создания полнотражный клон Спайка SARS, pBSnSh. In vitro транскрипция pBSnSh с последующим переводом в лизат ретикулоцитов кролика приводили к способ получения единичного полипептида с расчетной молекулярной массой от 1 до 5 мкм. .о нас.140 КДА.

[1609] вставка этой плазмиды была реклонирована через XhoI, а не I в а мамлианский вектор экспрессии pCMVIII (Srivastava et al. (2003) *J. Virol.* 77: 11244-11259), чтобы создать конструкцию, nSh (рис. 74A). Фрагмент ПЦР содержащий спайковый белок 1195 аминокислот, который был удален для трансмембранный домен (TM) и цистеин-богатый цитоплазматический хвост (Ки) были усиленный и клонированный вектор pCMVIII для генерации конструктора nShATC (ИНЖИР. 74B). Обе конструкции были маркированы с шестью остатками гистидина при с-конечная точка, чтобы помочь в их характеристике. The Xho I / Not I фрагмент без гистидиновой метки также был подклантирован в альфавирус репликон векторная магистраль pVCRchim2. 1 для использования в производстве An alphavirus replicon частица химеры, которая экспрессирует белок S. Производство и характеристика дефектного альфавирусного вектора репликации частицы были выполнены в основном так, как описано ранее (Perri et al. (2003) *J. Virol.* 77: 10394-10403; Polo et al. (1999) *PNAS USA.* 96:4598-4603). Полученные частицы вектора альфавируса были названы как ВИ / СИН.

[1610] клетки COS7 и клетки ВНК-21 были поддержаны в доработанном Dulbecco Орлиная среда дополнена 10% фетальной бычьей сывороткой при 37 ° С.степень. С. и 5% CO.SUB.2 в воздухе. Клетки COS7 были трансфицированы с экспрессией плазмиды (nSh, nSh.DELTA.TC) использование набора для трансфекции (TransIt-COS, Mirus) в соответствии с протоколом производителя. Клетки были промыты один раз с ледяным PBS и лизнул с 1.раз. Лизис буфер (20 мм швабры, 10 мм NaCl, 1,5 мм MgCl.SUB.2, и 1% Тритон X-100) содержа полное минное ингибитор протеазы (Roche). После 30-минутной инкубации на льду образует мусор очищается центрифугированием. Очищенный лизат был либо очищен, либо используется непосредственно в западном промокании.

[1611] для очистки секретируемых спайковых белков, среда из трансфицированных клеток был собран и подвергнут центрифугированию при 12000 об / мин в течение 10 мин до удалите клеточный мусор. Очищенную среду наносили на Кона-агарозу колонка (векторная Лаборатория). Колонку обильно промывали 20 мм натрия фосфатный буфер, а затем связанные белки элюировали 1М метилом .альфа.-D-маннопиранозид (ММП), 1М NaCl в 20 мм

фосфате натрия буфер. Применяли колоночные фракции, содержащие спайковые белки SARS-CoV к системе очищения протеина MagneHis (Promega) следуя за протоколом предложенный изготовителем.

[1612] для анализа western blot белки были разделены на 4-20% SDS-страница и после этого перенесенный электрофоретически к нитроцеллюлозе мембрана (Invitrogen). Мембрана была заблокирована в блокирующем буфере (5% обезжиренный молоко и 0,1% Твин 20 в PBS) и инкубировали с указанным антителом при комнатную температуру в течение 1 ч промывают и зондируют пероксидазой хрена (HRP) - конъюгированное вторичное антитело (Biosource), за которым следует хемиллюминесценция (система ECL, Amersham) и экспонируется рентгеновскими пленками. То используемые антитела представляли собой мышиные моноклональные антигистидиновое антитело (анти-*ego.cndot.tag Mab, Novagen*), поликлональный антипептид кролика антитело против SARS-CoV spike protein (SmPab, Abgent), или кролика анти-SARS сыворотки (2BE), полученные иммунизацией кроликов очищенными Торс-ков Вирион. Последний имеет в культуре клеток нейтрализующий титр 1/2,500. Если не указано иное, антитело было использовано на 1/1, 000 для анти-гистидиновые антитела и SmPab и 1/10 000 для анти-SARS кроличьих сывороток.

[1613] некоторые спайковые белки были обработаны пептид-N-гликозидазой F (PNGase F). Лизаты клеток были разведены в 0,5% SDS и 1% .бета.- меркаптоэтанол и денатурат при 100.степень. С. На 10 min. После 2-кратное разведение с 1% НП-40 в 50 мм фосфате натрия (pH 7,5) , образцы были обработаны с PNGase F (NEB) на 37.степень. С. за 1 час. Обработанные ферментами образцы были проанализированы на 4-12% SDS-страницы в уменьшении состоянии. Для частичного переваривания с PNGase, лизаты клетки были разбавленный с 50 мм фосфатом натрия (ПЭ-аш 6,0) содержа 0.75% Тритон-KC и обработанный с PNGase F (Calbiochem) на 37.степень. С. За 3 часа. Фермент-обработанные образцы были проанализированы 4-20% SDS-страниц в редуцирующем режиме состояние.

[1614] западные кляксы клеток через 48 часов после трансфекции показаны в ИНЖИР. 75. Белок S был обнаружен в лизатах клеток в виде дублета с расчетная молекулярная масса .о нас.170-180 КДА, когда лизат был сваренный и проанализированный в условиях уменьшения SDS-страницы (фиг. 75А, пер. 3). Этот дублет, по-видимому, является результатом дифференциального гликозилирования одного полипептидный продукт с момента предварительной обработки клеточного лизата Пнгазой F уменьшил дублет до одного вида .о нас.140 КДА (рис. 75А, пер. 4). Это-ожидаемый размер, предсказанный от последовательности aa для а полнометражный, неповрежденный полипептидный продукт. Этот эксперимент показывает, что полная длина SARS-CoV S выражена в клетках млекопитающих как одиночный, нерастворимый полипептид, но в двух дифференцированно гликозилированных формах, gp170 и gp180 соответственно. В отличие от двух с гликоформ, кодируемых с помощью полнометражная последовательность, ни одна из которых не была секретирована, S. DELTA. белок продукт был обнаружен как в клеточных лизатах (рис. 75А, пер. 5), а также в клеточной питательной среде (рис. 75В, lane3) как одиночный вид 160 КДА.

[1615] для того чтобы в дальнейшем охарактеризовать внутриклеточную обработку протеин S, и как описано выше, клетки ВНК21 были заражены с неполноценные частицы альфавируса выражая полнометражное С. на столбе 6x инфекция с MOI 5, зараженные клетки были импом Ульс обозначенным на 1 hr с L - [отхлебывать.35S] метионин / цистеин и преследовали в течение 2 или 4 часов. То [отхлебывать.35S] - Меченый белок S был иммуно-осажден с использованием кролика антисыворотка, повышенная против инактивированного, очищенного вируса, а затем перевариваемая с Endo H. обработка Endo H включила разбавление с буфером образца (50 мм фосфат натрия, 0,1% SDS, 50 мм DTT, pH 6,0) и кипячение в течение 5 минута. После денатурации образцы дополнительно разбавляли 0,75% Тритон-x 100 и обработанный эндогликозидазой н (Эндо H) следующим образом протокол изготовления (Calbiochem) на 3 hr на 37.степень. С. К обработанным ферментами образцам добавляли гель-загрузочный буфер, содержащий 0,1% SDS и DTT и проанализированы 8% SDS-страниц.

[1616] как переваренные, так и непереваренные белки были сварены в SDS и анализируется путем уменьшения SDS-страницы (Рис. 55). После 1-часового импульса, S белок был виден как один компонент gp170, который был Эндо H чувствительные (полосы 1 и 2). После 2-часовой погони, новый вид (gp180) был присутствует вместе с gp170 примерно в равных пропорциях (lane3). После 4-часовой погони, вид gp180 был доминирующим белком S компонент (Майна 5) который теперь был Эндо H упорным (майны 5 и 6). Этот данные согласуются с тем, что gp170 является ER-резидентным гликопротеином содержащие высокие цепи маннозы и имеющие gp180, соответствующие а Обработанный Гольджи гликопротеин, содержащий Эндо-H-резистентный комплекс олигосахариды.

[1617] чувствительность Эндо H С-концевой точки удалена S. DELTA. белок очищенный от клеточных питательных сред ws также протестирован. Как показано на фиг. 76, то С. Дельта. обнаружено, что наблюдаемые в клеточных лизатах Эндо H чувствительны (полосы 1 и 2), в то время как секреторируемый S. DELTA. в клеточных культуральных средах было Эндо H упорный (майны 3 и 4). Этот результат согласуется с этим гликопротеин, синтезируемый в незрелой форме в ER до переход к Гольджи где сложный углевод добавлен и протеин после этого сделал секретным.

[1618] как уже было описано, белок S, экспрессируемый в клетках COS7, был обнаружен как дублет gp170 / gp180 в анализе клеток western blot лизаты, которые были полностью денатурированы кипячением в присутствии DTT. Однако, большинство протеина С было обнаружено как высокомолекулярное гликопротеин в диапазоне 440-669 КДА, когда тот же лизат клетки не был жар-денатурированный перед анализом западного блага используя SDS-страницу (FIG. 77, пер. 1). То.о нас.500 видов КДА было устойчиво к обработке 10 мм DTT (полоса 3) и не диссоциирует в мономерную форму, если лизат не образуется был впервые тепло-денатурирован на 100.степень. С. (пер. 4). В отличие от, олигомерная форма тест-белка (тиреоглобулина), из которой четвертичная структура удерживается дисульфидом-связь была преобразована в форму субъединицы путем обработка 10 mM DTT. Эти данные позволяют предположить, что В.о нас.500 КДА олигомерная форма протеина S не дисульфид-соединена и жара лабильна. Чтобы подтвердить теплочувствительность .о нас.500 KDA видов S протеин, эксперимент по жар-денатурации был повторен но без DTT. Как показано на фиг. 78, денатурация жары протеина 500 КДА на 100.степень. С. одного было достаточно, чтобы преобразовать его в мономерные формы gp170/180 (пер. 4). Используя 80.степень. С. Шаг жар-денатурации, оба .о нас.500 КДА и мономерные формы были обнаружены в аналогичной пропорции (пер. 3).

[1619] для того, чтобы исследовать дальше, является ли это .о нас.500 КДА вид представляет собой олигомер белка S в нативной конформации, сравнительный анализ с Вирион-производный S-гликопротеином, полученным из Vero проводили культивирование клеток. Очищенные вирионы были солибилизованы в 1% SDS до анализа Western blot после страницы SDS. Наличие самого .о нас.Олигомер спайкового белка 500 КДА был подтвержден в частицах вириона (ИНЖИР. 79, пер. 1). Кроме того, тепловая денатурация солибилизованных вирионов произведенное такое же преобразование олигомер-к-мономера как увидено с полноразмерный рекомбинантный S (полосы 2,3). Олигомерная природа вириона S был дополнительно проанализирован в эксперименте по кросслинkinгу. Аликвоты из инактивированный Вирион из градиентных фракций сахарозы обрабатывали 10% SDS в конечной концентрации 1% и разбавляют в 2 раза с помощью 0,2 м Триэтанолламин-HCl (pH 8, Sigma); Диметилсуберимидат (DMS; Пирс Химическая Компания.) затем добавляли из свежеприготовленного раствора (10 мг / мл в 0,2 м триэтанолламин-HCl) в конечной концентрации 3,3 мг/мл. Через 2 часа при комнатной температуре образцы концентрировали с Центриконом-30 и анализировали методом окрашивания серебром после электрофореза на 4% полиакриламиде гель. Как необработанные, так и шитые ДМС вирионные белки были тепло-денатурированное, а также тепловое воздействие на содержание олигомера структура анализировалась методом SDS-страничного и серебряного окрашивания (рис. 80). В отсутствие шивки, тепловой денатурации привело к замене из.о нас.500 видов Спайка КD протеина с видом мономера. В контраст, в кросс-связанных белках, уровнях самого .о нас.500 кд причем вид мономера после нагревания существенно не изменился. Эти данные подтверждают тот факт, что В.о нас.Протеин 500 kD олигомер S мономерные белки, которые связаны нековалентно. После кросслинkinга и кипяток, то .о нас.500 КДА виды мигрировали как несколько более медленные диффузные форма чем необработанная форма. Этот сдвиг подвижности, вероятно, связан с а структурные изменения, возникающие в результате кипения. Кроме того, незначительный белок разновидности ...о нас.300 кд, которые могут представлять собой несвязанный Димер S, это было видно.

[1620] чтобы точнее оценить размер рекомбинанта .о нас.500 вид КДА с выраженный в клетках КОС7, лизате клетки КОС7 содержа Белковый олигомер S фракционировали с использованием размерно-исключающей колонки хроматография. Большая часть из них .о нас.Олигомер 500 КДА со-элюированный с протеином отметки 572 КДА. Взятые вместе, эти эксперименты показывают, что то .о нас.500 видов КДА S увиденных в клетке COS7 лизаты, вероятно, являются гомотимером мономера белка S.

[1621] олигомерное состояние S. DELTA. спайковый белок был также исследовано после экспрессии в клетках COS7. Как показано на фиг. 81, то рекомбинантный S. DELTA. также были обнаружены белки, присутствующие в лизатах клеток в высокомолекулярных формах веса .о нас.Диапазон 500 КДА, когда лизат не был нагрет до анализа SDS-PAGE и Western blot (пер. 1). Однако доказана эффективность олигомеризации внутриклеточным S.

DELTA. белок, по-видимому, намного меньше (Протеин S под такими же западными условиями анализа. А теплочувствительность тест по этому поводу .о нас.500 КДА белка показали, что S. DELTA. олигомер был более жара лабильная чем это из полнометражного олигомера S, как показано по > 90% конверсии всех .о нас.500 видов КДА в мономерные формы Sd на 80.степень. С. (пер. 2). Кроме того (рис. 82), то большая часть секретрируемого S. DELTA. белок был найден в мономерной форме с.о нас.500 видов КДА едва обнаруживаемых (и только обнаруживаемых когда протеин был нагружен в избытке для западного анализа) (Майна 1). Около температура выше 80 градусов.степень. С., Все секретрируется S. DELTA. белки были обнаружен в виде мономеров (полосы 2, 3).

[1622] В.о нас.Протеин 500кда гликозилирован, и влияние исследовано дегликозилирование на его связывание с антителами. Рекомбинантный ген Лизат COS7 был обработан с PNGase F под поп-денатурируя состоянием (как описано выше) и проанализировано western blot. Как показано на фиг. 83, дегликозилирование не повлияло на связывание антигистидинового антитела Mab к обработанному Олигомеру S (полосы 2,3). Тем не менее, это скомпрометировало реактивность с антисерой кролика поднятой против очищенного вируса (Майна 6). Эта антисыворотка связывается с производным вириона S в анализе western blot только тогда, когда DTT опущен из образца для SDS-страницы, указывающей, что он признает главным образом разрывной, конформационный эпитоп(ы). Этот также было показано, что антисера обладает высоким титром вирусной нейтрализации антитела. Его отсутствие связывания с дегликозилированным, рекомбинантным S предполагает что углевод активно способствует к более высокому порядку, родной структура олигомера полипептида S.

[1623] разница между рекомбинантным S и S. DELTA. белок есть наличие или отсутствие TM-и Cys-богатых доменов на С-терминале. Это различие предсказывает, что полная длина S будет найдена связанной с мембранной фракцией в то время как Sd будет находиться в растворимой фракции на лизис трансфицированных клеток. Следовательно, NSH-или NSH.DELTA.ТС-трансфицированный клетки лизировали в условиях гипотонии и растворимого цитозоля фракцию отделяли от нерастворимой мембранной фракции путем центрифугирование (рис. 48). Как показано на фиг. 84, протеин S было найдено внутри мембранной фракции (DF) как а .о нас.500 КДА и 180/170 КДА вид (линия 4) но не был обнаружен в растворимой фракции цитозоля (АФ) (пер. 3). Однако усеченная S. DELTA. протеин был найден как а мономерные виды (gp170) в обеих фракциях (полосы 5,6). Это указывает на то, что что домены TM с-стержня и Cys-богатые люди необходимы для анкоредж протеина S к мембране клетки.

[1624] клеточное расположение S и S. DELTA. белки в клетках COS7 анализировали методом непрямой иммунофлуоресцентной микроскопии. В 48 часов после трансфекции клетки были непосредственно фиксированы 2% параформальдегидом без моющего средства для окрашивания поверхности клеток или обработанной моющим средством затем следует раствор Cytofix/Cytoperm для внутриклеточного окрашивания. Исправлено клетки после этого были запянтаны с сыворотками анти -- SARS кролика (2BE) и FITC-конъюгированное антитело. NSH-трансфицированные клетки показали очаги S белок, указывающий на локализацию Гольджи (рис. 85A), в то время как pSh. DELTA. ТС-трансфицированные клетки отображают равномерное распределение С. Дельта. белок по всей цитоплазме, указывающий на локализацию ER (ИНЖИР. 85B). В то время как полный белок S также наблюдался на поверхности трансфицированных клеток в незафиксированных клетках (рис. 85D), The S. DELTA. был не обнаруживается на поверхности ячейки (рис. 85E). Эти результаты указывают на то, что роль, которую играют TM-и CyS-богатые домены в закреплении белка S к плазматическая мембрана. Хотя за это, скорее всего, отвечает только TM-регион для анкореджа мембраны, потенциальная роль сыгранная зоной Cys-богатые люди это еще предстоит выяснить.

[1625] таким образом, рекомбинантный полноразмерный белок S SARS является N-связанным гликопротеин с расчетной молекулярной массой 170-180, 000 КДА. Дегликозилирование с PNGase F привело к полипептиду ожидаемого размер для нераскрытого, закодированного полипептида (140 КДА). Оба переходные и стабильные экспрессия полнометражного гена SARS-CoV S является нековалентно ассоциированным и очень стабильным. Олигомеры S присутствующие внутри было показано, что клеточный лизат устойчив к снижению на 10 мм DTT, детергентная обработка с 1% SDS, и денатурация жары на до 60.степень. С. Инкубация при температуре выше >80.степень. С. приводило к диссоциации тримерного комплекса, о чем свидетельствует уменьшение тримера с сопутствующим увеличением мономерных полос. Индуцированный температурой внешний вид высоко-маннозилированного gp170 (ER форма мономера) , а также комплекс-гликозилированный gp180 (Мономер Гольджи форма) предполагает, что тримеризация может произойти до начала транспортировки мономерный спайковый белок к медиальному аппарату Гольджи. Это непротиворечиво с другими отчетами для ТГЕВ, вируса гриппа ХА, и везикулярного стоматита белки вируса G. С этими протеинами, было сообщены, что принимает тримеризация поместите перед добавлением сложных олигосахаридов в аппарат Гольджи.

[1626] рекомбинантный белок S не был секретирован в клеточную культуру средство за исключением аминокислот к-терминала 60 содержа TM-регион и CyS-богатый хвост был удален.

[1627] четвертичная структура полноразмерного рекомбинантного белка S было исследовано с использованием поперечной обработки шивки, термоденатурации и анализа фракционирования размера. Полученные результаты согласуются с данными рекомбинантный белок S, существующий как гомотример .о нас.500 КДА. Похожие анализ производных вириона S дал те же результаты. Такой тримерик структура была сообщена для других охваченных вирусом РНК: гемагглютинин НА вируса гриппа, гетеродимер E1-E2 альфавирусы и G-белок вируса везикулярного стоматита. Инкубации в условиях снижения указывают на то, что тримерная структура SARS-CoV S является нековалентно ассоциированным и очень стабильным. Олигомеры S присутствующие внутри было показано, что клеточный лизат устойчив к снижению на 10 мм DTT, детергентная обработка с 1% SDS, и денатурация жары на до 60.степень. С. Инкубация при температуре выше >80.степень. С. приводило к диссоциации тримерного комплекса, о чем свидетельствует уменьшение тримера с сопутствующим увеличением мономерных полос. Индуцированный температурой внешний вид высоко-маннозилированного gp170 (ER форма мономера) , а также комплекс-гликозилированный gp180 (Мономер Гольджи форма) предполагает, что тримеризация может произойти до начала транспортировки мономерный спайковый белок к медиальному аппарату Гольджи. Это непротиворечиво с другими отчетами для ТГЕВ, вируса гриппа ХА, и везикулярного стоматита белки вируса G. С этими протеинами, было сообщены, что принимает тримеризация поместите перед добавлением сложных олигосахаридов в аппарат Гольджи.

[1628] С-окончательно усеченная форма S была найдена в лизате клетки как в олигомерных, так и в мономерных формах с частотой 10% и 90%, соответственно. Усеченный белок, выделенный в среду, был найден полностью гликозилированный и он был по существу весь в мономерной форме. Мы заключаем: что аминокислоты С-стержня 60 гликопротеина S содержат а мембранная анкерная область, влияющая на эффективность тримеризации. В S тримеризация протеина, возможно что регион к-терминала требуется для иницирования события и тройной многожильный спиральный змеевик структуры в области стержня S2 обеспечивают более дополнительную стабилизируя силу как увиденный в олигомере ха вируса гриппа.

Пример 24

СНО-клетки для экспрессии спайкового белка

[1629] линии ячеек СНО, которые стабильно выражают либо полную длину, либо были получены усеченные спайковые белки SARS-ков. Несколько стабильно были получены трансфицированные линии клеток СНО, а также рис. 73 шоу western blot данные из группы репрезентативных клонов.

Пример 25

Экспрессия в кишечной палочке

[1630] все Орф торс-ков (рис. 17, таблица 10) были клонированы в питомце вектор и выраженный как С-терминальные протеины сплавления His-Tag в E. coli. Белки размером менее 16 КД также экспрессировались как N-концевые ГСТ (Глутатион S-трансфераза) слияние белков с использованием вектора pGEX.

[1631] Nsp1 и Nsp2, два белка SARS-CoV с протеолитическим действием деятельность, не была выражена как полнометражные протеины должны к токсичности внутри Кишечная палочка. Вместо этого соответствующие гены были клонированы в разных частях для разделения каталитических остатков (Cys833 / His994 для Nsp1; His41 / Cys145 для Nsp2) в полученных рекомбинантных белках: Nsp1A от нуклеотиды 2719-5214 из AY310120; Nsp1B из нуклеотидов 5218-7371; Nsp1C от нуклеотида 7372-9984; Nsp2A от нуклеотида 9985-10416; Nsp2B из нуклеотида 10476-10902.

[1632] Nsp9 (SEQ ID NO: 9775) был разделен на две части: Nsp9A от нуклеотид 13371-14756; Nsp9B от нуклеотида 14757-16166.

[1633] Матрица (М), ORF3 и ORF7 содержат соответственно три, два и один элемент трансмембранные Домены. Эти белки были выражены в виде делеционных белков исключая первые 100 аминокислот (М и ORF3) или первые 18 аминокислоты (ORF7), которые включают гидрофобные области.

[1634] клонированные последовательности показаны в таблице 26.

[1635] для усиления клонированных последовательностей была использована двухэтапная стратегия. В первый этап-амплификация фрагментов ДНК, содержащих более одного ген или отдельный ген использовали секвенированную ДНК в качестве шаблона. Одиннадцать cDNA были амплифицированы последовательности: (1) фрагмент, названный ampIC1, включая гены кодирования для белка E, белка M,orf 7-8-9-10; (2) фрагмент, названный ampIC2, включая гены, кодирующие orf 3-4; (3) фрагмент, названный ampIC5, в том числе гены, кодирующие белки Nsp12 и Nsp13; (4) Nsp11gene; (5) Гены P28 и P65; (6) часть генов Nsp1B и Nsp1C; (7) фрагмент, названный ampIC9, включая гены, кодирующие белки Nsp2 и Nsp3; (8) а фрагмент, названный ampINsp4-7, включающий гены, кодирующие белки Nsp4, Nsp5, Nsp6, Nsp7 и для амплификации части гена Nsp9A; (9) Nsp 9B часть гена и ген Nsp10; (10) фрагмент, названный ampICO, в том числе гены, кодирующие белки Orf11, нуклеокапсид (N) и Orf12; (11) Nsp1A генная часть. Праймеры, используемые на этом первом этапе, приведены в таблице 27:

[1636] на втором этапе была выполнена амплификация отдельных генов использование фрагментов ДНК с первого этапа амплификации в качестве шаблонов. То грунтówki приведены в таблице 28.

[1637] из белков, где экспрессия была замечена, он был либо в тела включения (нерастворимые) или в растворимой форме. Очищение продолжалось на соответствующем материале. В таблице 29 показана молекулярная масса выраженные фрагменты ОРФОВ SARS-CoV, были ли они клонированы (+ или -), было ли видно, что клонированный фрагмент был выражен (+или -) и форма белка, которая была выбрана для очистки.

[1638] где белок был растворимым His-маркированным продуктом, одна колония был исполосован и вырос за ночь в 37 лет.степень. С. on a LB / Amp (100 . му. г / мл) агаровая пластинка. Изолированная колония из этой пластины была привита в 20 мл LB / Amp (100 .му.г/мл) жидкостного средства и выращенный всю ночь на 37.степень. С. с дрожанием. Ночная культура была разбавлена 1: 30 в 1,0 L LB/Amp (100 .му.г/мл) жидкостное средство и позволенный вырасти на оптимальная температура (30 или 37.степень. С.) до достижения ОД550 Нм 0.6-0.8. Экспрессия рекомбинантного белка была индуцирована добавлением ИПТГ (конечная концентрация 1,0 мм) и культуру инкубировали в течение дальнейшего времени 3 часа. Бактерии были собраны центрифугированием при температуре 8000.раз.г для 15 минута в 4.степень. С. бактериальная лепешка была ресуспендирована в 10 ml холода буфер а (300 мм NaCl, 50 мм фосфатный буфер, 10 мм имидазол, рН 8,0). Клетки были нарушены sonication (или французская пресса) на льду четыре раза в течение 30 сек при 40 Вт с помощью зонда Бронсона 450 и центрифугирования при 13 000.раз. г в течение 30 мин при 4.степень. Супернатанты С. были смешаны с 150 . му. l Ni.отхлебывать.2+-смола (предварительно уравновешенная буфером а) и инкубировали при комнатной температуре с мягким перемешиванием в течение 30 мин. Смола был Хелатировать подачу Сефарозы быструю (Pharmacia), подготовленную согласно протокол производителя. Дозированное приготовление центрифугировали при следующем соотношении компонентов: 700.раз.г в течение 5 мин при температуре 4.степень. С. и супернатант отбрасывается. То смолу промывали дважды (порционно) 10 мл буфера а в течение 10 мин, ресуспендируют в 1,0 мл буфера а и загружают на одноразовую колонку. То смолу продолжали промывать буфером а при температуре 4.степень. С. до тех пор, пока OD280nm из пропускать-через достигло 0.02-0.01. Смола была дальше промывают холодным буфером В(300 мм NaCl, 50 мм фосфатный буфер, 20 мм имидазол, рН 8,0) до тех пор, пока не достигнет OD280 Нм проходного сечения 0.02-0.01. Протеин His-fusion был элюирован добавлением 700. му. l из холодный элюционный буфер С (300 мм NaCl, 50 мм фосфатный буфер, 250 мм имидазола, рН 8,0)и фракций, собранных до ОД.SUB.280мм указанный рекомбинантный белок был получен полностью. 20. му. l аликвоты из каждая фракция элюции была проанализирована методом SDS-PAGE. Концентрация белка были оценены с помощью анализа Брэдфорда.

[1639] где протеин был увиден как неразрешимый продукт, включение тела очищали следующим образом: гомогенизировали клетки (5 г влажной массы) в 25 мл 0,1 м Трис HCl рН 7, 1 мм ЭДТА, при 4.степень. С. используя ultraturax (10000 rpm); добавьте 1,5 mg лизоцима в клетки грамма; смешайте скоро с ultraturax и инкубировать в 4.степень. С. Для 30'; используйте sonication или высоконапорная гомогенизация для того чтобы нарушить клетки; для того чтобы усвоить ДНК, добавьте MgCl.SUB.2 к окончательной концентрации 3 мм и DNase к окончательному концентрации 10 мкг / мл и инкубируют 30' при температуре 25.степень. С. добавьте 0.5 vol 60 мм ЭДТА, 6% Тритон x-100, 1,5 м NaCl рН 7,0 к раствору, и инкубируйте в течение 30' при 4.степень. С.; центрифугирование на 31000 g для 10 ' на 4.степень. С.; повторно суспендировать гранулу в 40 мл 0,1 м Трис HCl рН 7,0, 20 мм EDTA с использованием ultraturax; центрифугирование при 31000 g для 10' а 4.степень. С.; храните лепешку IB на -20.степень. С.

[1640] результаты выражения приведены на фиг. От 86 до 105. Примеры чистота и выход приведены в таблице 30.

Пример 26

Сохранение критического Эпитопа на усеченном Спайковом Антигене

[1641] было получено моноклональное антитело человека, обладающее нейтрализующей активностью. испытано в анализе ELISA для реактивности с очищенным усеченным шипом белок. Кратко, плиты ELISA были покрыны с усеченной формой спайковый белок в концентрации 1. му. г / ml (100 .му./well) по инкубация тарелок на ночь в 4 часа.степень. С. тарелки были вымыты, неспецифические сайты привязки были заблокированы, а затем различные разведения антитела были добавлены и пластины инкубировали в течение 1 часа в помещении температура. В конце инкубации тарелки опрмывали и перевязывали антитело было обнаружено при использовании анти-человеческого IgG, конъюгированного с хреном пероксидаза (HRP) и соответствующий субстрат. Оптическая плотность каждая скважина регистрировалась при 405 нм с помощью считывателя ELISA. Данные таковы показано на фиг. 69 и наглядно демонстрируют, что нейтрализующий эпитоп узанный mAb сохраняется и подвергается действию на рекомбинантном усеченный спайковый белок.

Пример 27

Различные Спайковые Вакцины

[1642] очищенный усеченный протеин шипа был использован для того чтобы иммунизировать мышей и уровень связывающих антител, индуцированных против усеченного спайкового белка определяли методом ИФА-анализа. Кратко была иммунизирована группа из 10 мышей с 3. му. г усеченного спайкового белка, адьювантного в MF59 при 0, 4 и 8 с интервалом в несколько недель. Образцы сывороток были взяты у этих животных и способ определения антител, индуцированных усеченным спайковым белком в иммуноферментном анализе анализ. Дополнительная группа из 8 мышей была иммунизирована 75 джиг ДНК кодирование усеченной формы спайкового белка на частицах PLG при 0, 4 и 13 недель интервалы, сыворотки были собраны и проанализированы как выше для анти-спайковые антитела, как указано выше

[1643] профиль связывания антител, индуцированных в каждой группе, был следующим: строится как среднее геометрическое значение титра (GMT). По сравнению с плазмидной ДНК-вакциной экспрессирующий усеченный спайковый антиген и доставленный с использованием ПЛГ образование микрочастицы, очищенный усеченный протеин шипа было значительно более мощный для наводить сильные реакции антитела. В дальнейшем сравнение с реакциями антител, индуцированными инактивацией У одного и того же штамма мыши выявлен БПЛ-ОРВИ-ков (уже проявленный защитный) что величина ответов антитела наведенных очищенным усеченным спайковый белок и инактивированная вирусвакцина находятся в одном диапазоне (ИНЖИР. 70).

[1644] нейтрализующий потенциал антител, индуцированных рекомбинантный усеченный спайковый белок, или плазмидная ДНК, экспрессирующая то же самое спайковый антиген, также были оценены. Значения GMT, полученные в обоих случаях группы показаны на фиг. 71. Из этих данных следует, что очищенный белок значительно эффективнее индуцирует нейтрализацию реакция антител против Спайка SARS-CoV. Кроме того, титры обезвреживания типично наведенные очищенным усеченным шипом белок сопоставим с титрами нейтрализации, индуцированными инактивированным Вакцина от ОРВИ-ков.

[1645] рис. 72 показано сравнение уровней связывания антител (ИФА, Ось X) с титрами нейтрализации (ось Y). В общем есть очень хорошая корреляция между связывающими и нейтрализующими антителами. То в нижней левой группе показаны соотношения через 2 недели после 3-й иммунизации с

использованием ДНК-вакцина; правая верхняя группа показывает соотношение через 2 недели после 2-го иммунизация с помощью белковой вакцины. Обе формы вакцины показывают а последовательная корреляция.

[1646] в дальнейших экспериментах была показана способность ДНК-вакцины вызывать изучен иммунный ответ у мышей. Мышей иммунизировали с помощью рCMV-nSdTC плазида, либо свободная, либо с микрочастицами ПЛГ. Сыворотка от мышей была затем использовали в качестве окрашивающего антитела против культивируемых 293 клеток, которые имели был пронзен Спайком, либо полноразмерным, либо усеченным. Ячейка были центрифугированы перед тестированием и гранулы были лизированы. Антитело было испытано против супернатанта культуры и против лизата клетки. Как показано на фиг. 112, сыворотка мыши мог обнаружить протеин шипа внутри лизат клеток, которые экспрессируют полноразмерный Спайк и в составе супернатант клеток, экспрессирующих усеченный спайковый белок. Результаты были сопоставимы с окрашиванием, наблюдаемым при использовании кроличьей сыворотки, которая имела были получены после иммунизации целым убитым вирусом. Таким образом анти -- шип антитела могут быть индуцированы с помощью вакцинации ДНК.

Пример 28

Экспрессионные кассеты в рCMV

[1647] последовательность плазмиды рCMVKm2 задается как SEQ ID NO: 9923. Гены кодирование спайкового белка либо в полноразмерной форме (рCMVKm2 SARS Spike NS; SEQ ID NO: 9921) или в своем .DELTA.TC форма (Pcmvkm2 торс шип nS.DELTA.TC; SEQ ID NO: 9922) были вставлены в этот основной вектор.

[1648] мыши были иммунизированы этими векторами, и с подобными векторами кодирование белков N,М или Е. Векторы, кодирующие одни и те же белки, но с оптимизированным использованием кодона также были подготовлены. Кодоны были оптимизированы для эффективное человеческое выражение, начиная с последовательности FRA (GenBank: AY310120). Оптимизированные последовательности являются следующими: N (SEQ ID NO: 9924); M (SEQ ID NO: 9925); E (SEQ ID NO: 9926).

[1649] после Администрации, выражение протеинов смогло быть обнаружено мимо иммунофлуоресценция во всех случаях. Например, рис. 106 шоу результаты иммунофлуоресценции (с использованием анти-SARS кроличьей сыворотки) после того, как введение вектора, кодирующего оптимизированный N антиген, выявляющий высокий уровень выражение уровня. Мыши, получающие только контрольный вектор, не показали никаких изменений флуоресценция.

[1650] рис. 107 сравнение иммунофлуоресценции (с использованием Абгента анти-м антитело) нативной последовательности м (107A) или кодон-оптимизированного м последовательность (107B). Аналогично этому, рис. 108 сравнивает иммунофлуоресценцию (использование Абгентное анти-е антитело) нативной последовательности е (108A) или кодон-оптимизированная последовательность Е (108B).

[1651] четыре группы мышей (по 8 мышей в каждой группе) были иммунизированы с помощью: (1) SARS NS Spike, nsdct усеченный Спайк и N белков; (2) рCMV-SARS-nSdTC: DNA+DNA-PLG на неделе 0,4 и 13 ЗК; (3) CMV-nS: DNA+DNA-PLG+Vee / SIN Rep при 0, 4 и 9 wks; (4) Vee / SIN Rep-SARS-nS three раз в 0, 4 и 13 ЗК. Сыворотки крови из всех групп признаются атипичными НС и белки nSdTC, а также показали связывание и нейтрализацию вирусов Активность.

Пример 29

Расщепление Спайкового Белка

[1652] для изучения влияния протеолитического расщепления на атипичную пневмонию Спайковый белок, он был выражен в различных формах у E. coli, в том числе: (1) полноразмерный S1-S2; (2) отдельно S1; (3) HR1 heptad; и (4) HR2 heptad. Экспрессированные белки использовались для повышения иммунитета кроличьих сывороток, которые были затем используется для визуализации западных пятен клеток Vero, либо инфицированных, либо нет не заражен ОРВИ-ков.

[1653] рис. 109 показано западное пятно с использованием разведения антитела 1: 10000 поднятый против любого домена S1 или не сохраненных доменов S1-S2. ИНЖИР. 110 показывает западную кляксу, используя разведение антитела 1: 10000, поднятое против каждого из четырех белков. Разница в реактивности антигена это сразу видно.

[1654] рис. 111 показывает аналогичные данные. Каждая сыворотка была протестирована против четырех полосы движения, причем эти полосы движения goou расположены слева направо: (а) сыворотка в 1: 500 разведение, инфицированные SARS-CoV клетки; b) сыворотка в разведении 1: 500, неинфицированные клетки; c) сыворотка в разведении 1: 2500, инфицированная торс-ков клетки; D) сыворотка в разведении 1: 2500, неинфицированные клетки. Опять же, the разница в реактивности антигена легко заметна.

[1655] фиг. 109-111 показывают, что спайковый белок существует в различных формах в инфицированных клетках Vero, с размерами ок. 75 КДА, 90 КДА, 180 КДА и >250 КДА. Спайковый белок расщепляется (по крайней мере частично) либо внутриклеточное или после выпуска частиц.

[1656] если ферментативное расщепление шипа коронавируса гепатита мыши протеин заблокирован после этого сплавливание клетк-клетки (образование syncytia) также ингибируется, но слияние вируса с клеткой не происходит (de Naan et al. (2004) J Virol). Синцитии наблюдаются in vivo в легких у больных ОРВИ-инфицированных, но не наблюдаются в культурах клеток Vero при ОРВИ. Ингибирование шипа таким образом, расщепление белка может быть использовано для предотвращения образования синцития и родственная патология, даже если вирусная инфекционность не может быть прегражена.

Пример 30

Очистка протеазы SARS

[1657] клетки были выращены в 37 лет.степень. С. До середины логарифмической фазы и индуцированной с 0,2% L-арабинозы. Клетки были собраны центрифугированием, и клетки ресуспендировали в лизисном буфере (LB), содержащем 20 мм Трис pH 7,5, 500 мм NaCl, 5% глицерин в/в, 0,05% Тритон х-100, 5 мм. beta.МЕ, 5 мм имидазол и полные ингибиторы протеаз (-) ЭДТА. Была добавлена бензоаза до конечной концентрации 50 Ед/мл лизата. Затем клетки лизировали используя 2 пропуска через пре-охлажденный микрофлюидизатор. А лизат был ... осветлено высокоскоростным центрифугированием при температуре 44000.раз. g. уточненный лизат был приложен к подготовленной колонке Pharmacia хелатируа FF порученной с сульфатом никеля. После применения лизата колонка была заполнена водой. помыть с 5 томами колонки LB, следовать за 5 томами колонки LB дополняется 45 мм имидазолом. Затем колонка была элюирована с помощью LB дополняется 250 мм имидазолом. Чистота выделенной протеазы SARS было 50%. Фракции, содержащие протеазу, объединяли, доводя до 5 мм ЭТИЛЕНДИАМИНТЕТРАЦЕТАТ, а затем наносят на гелевую фильтрующую колонку Superdex 200 уравнивается в 20 мм Трис pH 7,5, 150 мм NaCl, 5% V / V глицерина, 0,05% Triton X-100, и 5 mM DTT. Чистота выделенной протеазы SARS составила 70%. Опять же, фракции, содержащие протеазу, были объединены, а затем сохранены при -80.степень. С. до тех пор пока использованный. Анализ активности, масс-спектрометрия и вестерн для положительной идентификации белка был использован Блот-анализ (рис. 133). Все шаги были унесены с рге-охлажденными буферами, и сдержаны на 4.степень. С. Для как можно большей части подготовки.

Западный из фракций очистки протеазы SARS

[1658] протокол: кратко, концентрация протеина была основана на Абсорбансе при 280 Нм, а также соомассе окрашивают гель оценки чистоты. Белок был запущен на 4-20% градиентном геле, и перенесенный к нитроцеллюлозе. Это пятно было ... после этого прегражено с 3% BSA, зондированным с анти -- pentaHis IgG мыши, и после этого зондированный с вторичным антителом к IgG мыши проспряганному с HRP. То пятно визуализировали с помощью

набора ECL (Pharmacia Biotech). Результаты таковы показаны на фиг. 133 где а-пул калибровочных колонок, загруженный на 50, 100 и 200 НГ целевого белка и В-это иммобилизованная металлическая аффинная колонка пул загружается по 50, 100 и 200 НГ целевого белка.

Пример 31

Непрерывный анализ энзима переноса энергии резонанса Флуоресцирования (Лада)

[1659] пептид, содержащий ЭДАНЫ, донор флуоресценции и ДАБЦИЛ, Гаситель флуоресценции (DABCYL-VNSTLQ .градиент.СГЛРК-ЕДАНС) был синтезирован Суп. Бодрасть духа. (Дублин, Калифорния.). Пептид содержит место расщепления Gln-Ser в середине. Meyers, G. et al. Руководство по эксплуатации Протеолитические ферменты и Barrett, A et al., Академическая Пресса, Лондон, 1998 Год, 726-728. Прослежена протеолитическая активность протеазы SARS кинетически путем измерять уровень образования расщепленного продукта который содержит донор флуоресценции, SGLRK-EDANS с использованием Hitachi флюорометр (F-4500 FL Spec.) установите на возбуждение 340 Нм и 490 Нм длина волны излучения. 5. му. л запаса пептида 5 мм в решении ДМСО было добавляют в реакционную смесь, содержащую 295. МЮ. л стандартного буфера (75 мм Трис-Hcl, 25 мм NaOAc, 25 мм бис-Трис, 25 мм глицин, 5 мм ЭДТА, и 1 мм ЭДТА, pH 7,4) и 100 ul буфера или 100 ul протеазы 3,6 мкм исходный раствор. Кинетическая кривая была прослежена в течение 6 минут (the реакция была линейной со значением R2 0,998 (рис. 134)). Формирование системы флуоресценция (протеолитическая реакция), вероятно, зависит от фермента, так как концентрация фермента была утроена втрое, а флуоресценции было в три раза больше формируется в течение 6 минут временных рамок.

[1660] будет понятно, что изобретение было описано способом например только и изменения могут быть сделаны пока остающся внутри сфера применения и дух изобретения. ТАБЛИЦА-США-00065 Таблица 1 Патенты США и опубликованные международные патентные заявки Публикация Публикация Номер Название Дата Ус-3927216 1,2,4-Триазол Е-3-Карбоксамиды для ингибирования Вирусных инфекций Дек. 16, 1975 Ус-4010269 противовирусные Хиназолиновые композиции и способы применения Мар. 1, 1977 US-4065570 противовирусные 5 - (замещенные Бензал) Гидантоины Дек. 27, 1977 US-4089965 Тиазоллфенилгуанидины в качестве Антириновирусных агентов 16 мая 1978 г. США - 4122191 Антириновирусные агенты окт. 24, 1978 США - 4192895 Антириновирусные агенты Мар. 11, 1980 US-4254144 замещенные Бензонитрилы, обладающие противовирусной активностью Мар. 3, 1981 США-4264617 противовирусные 5 - (замещенные Бензал) Гидантоины Арг. 28, 1981 США-4287188 производные Пурина Сер. 1, 1981 Ус-4327088 Фосфоноокси-или Гликозилокси-замещенные Акрилофеноны, Композиции И Их Применение Арг. 27, 1982 US-4332820 замещенные Бензонитрилы, обладающие противовирусной активностью Jun. 1, 1982 СЕРАЗАМЕЩЕННЫЕ дифениловые эфиры US-4349568, обладающие противовирусной активностью Сен. 14, 1982 US-4352792 3-Алкоксифлавоны противовирусные агенты окт. 5, 1982 Ус-4371537 Серозамещенные Феноксипиридины, обладающие противовирусной активностью Февраль. 1, 1983 Ус-4423053 производные 2-Амино-5-(О-Сульфамидофенил) - 1,3,4-Тиадиазола Как Противовирусные Средства И Дек. 27, 1983 Способ Их Получения СЕРАЗАМЕЩЕННЫЕ дифениловые эфиры US-4505929, обладающие противовирусной активностью Мар. 19, 1985 Ус-4526897 гипертензивные Изоиндолин-2-Ил-Аминоимидазолины и Изоиндолин-2-Ил-Гуанидины Jul. 2, 1985 Ус-4558134 некоторые фенокси-пиридин-Карбонитрилы, обладающие противовирусным действием Активность Дек. 10, 1985 Ус-4629729, обладающий противовирусной активностью 2-Алкиламино-4,6-Дигало Пиримидины Дек. 16, 1986 Ус-4636492 ингибирование активности вирусной протеазы пептидом Галометилон Кетоны Ян. 13, 1987 US-4652552 тетрапептид Метилкетонные ингибиторы вирусных протеаз Мар. 24, 1987 US-4724233 терапевтическое применение Фосфонилметоксикаладеинонов Февраль. 9, 1988 США-4738984 Антириновирусные агенты апр. 19, 1988 Антивирусные композиции US-4847246, полученные из светлячков, и их способы Из Употребления Джул. 11, 1989 Новый фармацевтически активный препарат US-4855283 N-(2-Аминоацетиламино-2-Дезокси-Гексозил)- Амиды, - Карбаматы Aug. 8, 1989 И-Уреазы Соединения фосфора US-4885285, способы их получения, а также Их Использование Дек. 5, 1989 Ус-4956351 противовирусные фармацевтические композиции, содержащие Циклодекстрины Сен. 11, 1990 US-5001125 Противовирусно активные Пиридазинамины Мар. 19, 1991 США-5036072 противовирусное средство Jul. 30, 1991 US-5070090 Антипикорнавирусный Гертероциклический замещенный Морфолинил Алкилфенольные Эфиры Дек. 3, 1991 США-5100893 Антипикорнавирусные Пиридазинамины Мар. 31, 1992 US-5112825 Антириновирусные Гетероароматические Пиридазины 12 мая 1992 г. США-5157035 Противовирусно активные Пиридазинаны окт. 20, 1992 US-5240694 комбинированное противовирусное и Антимедиаторное лечение простудных заболеваний Авг. 31, 1993 Ус-5242924 Тетразолил - (фенокси и Феноксиалкил) - Пиперидинилпиридазины в качестве Противовирусных Средства Сер. 7, 1993 Ус-5278184 синтетические производные Пиррола и Пирролидина, пригодные для применения Терапия Инфекций, Вызванных Ян. 11, 1994 По Риновирусам Ус-5364865 фенокси - и Феноксикал-пиперидины в качестве противовирусных средств Ноя. 15, 1994 США-5453433 Тиадиазола и Антипикорнавирусные композиции Сер. 26, 1995 US-5492689 комбинированное лечение Вирустатическими Антимедиаторами (КОВАМ) общего действия Простуда Февраля. 20, 1996 Терапевтические Феноксикалпиридазины US-5514679 и промежуточные продукты для их получения 7 мая 1996 года Замещенные производные ХИНОЛИНА US-5514692, полезные в качестве Антипикорнавирусов Агенты 7 Мая 1996 Годы США-5523312 Антипикорнавирусные средства Jun. 4, 1996 США-5545653 антивирусные соединения Aug. 13, 1996 США-5552420 терапевтические Феноксикалазолы и Феноксикалазины Сер. 3, 1996 US-5567719 Тиадиазола и их применение в качестве Антипикорнавирусных агентов окт. 22, 1996 US-5580897 1,2-Дитиины, обладающие противогрибковой активностью Дек. 3, 1996 США-5618821 терапевтические Феноксикалгетероциклы апр. 8, 1997 США-5618849 перерало активные противовирусные соединения апр. 8, 1997 Ус-5648354 1,2-Дитиины, обладающие противогрибковой активностью Jul. 15, 1997 Ус-5650419 Тиадиазола и их применение в качестве Антипикорнавирусных средств Jul. 22, 1997 США-5693661 антивирусные соединения Дек. 2, 1997 US-5721261 терапевтические Феноксикалазолы и Феноксикалазины Feb. 24, 1998 Ус-5725859 лекарственное средство растительного происхождения С Вирустатическим и противовирусным действием Эффект Мар. 10, 1998 US-5750527 Тиадиазола и их применение в качестве Антипикорнавирусных агентов 12 мая, 1998 США-5750551 лечение вирусных заболеваний 12 мая 1998 года US-5762940 способы и композиции для ингибирования или уничтожения вирусов Или Ретровирусы Jun. 9, 1998 США-5763461 терапевтические Феноксикалгетероциклы Jun. 9, 1998 США-5821242 противовирусные соединения окт. 13, 1998 US-5821257 Тиадиазола и их применение в качестве Антипикорнавирусных агентов окт. 13, 1998 США-5821331 Антипикорнавирусные средства окт. 13, 1998 США-5846986 терапевтические Феноксикалазолы и Феноксикалазины Дек. 8, 1998 АНТИПИКОРНАВИРУСНЫЕ соединения US-5856530 и способы их применения, а также Подготовка Янв. 5, 1999 США-5891874 антивирусное соединение апр. 6, 1999 Антипикорнавирусные соединения US-5962487 и способы их применения, а также Подготовка Окт. 5, 1999 США-6004933 ингибиторы Цистеиновых протеаз Дек. 21, 1999 АНТИПИКОРНАВИРУСНЫЕ соединения US-6020371 композиции, содержащие их и Способы Их Применения Фев. 1, 2000 США-6087374 антивирусные соединения июл. 11, 2000 США-6114327 противовирусные соединения Сер. 5, 2000 US-6117844 способ и композиции для противовирусной терапии Сер. 12, 2000 Производные БИС (бензимидазола) US-6194447, служащие для блокирования оксия Агенты Фев. 27, 2001 Антипикорнавирусные соединения US-6214799 и способы их применения, а также Подготовка Апр. 10, 2001 США-6277891 оксид азота ингибирует риновирусную инфекцию Aug. 21, 2001 Антимикробные композиции US-6294186, содержащие аналог бензойной кислоты и Металлическая Соль Сер. 25, 2001 Антипикорнавирусные соединения US-6331554, содержащие их композиции и Способы Их Применения Дек. 18, 2001 США-6358971 противовирусные соединения Мар. 19, 2002 Антипикорнавирусные соединения US-6362166 и способы их применения, а также Подготовка Мар. 26, 2002 Ус-6414004 3-замещенные 5-Арил-4-Изоксазолкарбонитрилы, обладающие противовирусным действием Активность Июля. 2, 2002 Карбаматы US-6420591 и их композиции, а также способы их применения Для Лечение Рака, Джул. 16, 2002 Воспаление, Или Вирусная Инфекция США-6469018 соединения окт. 22, 2002 США-6498178 ингибиторы фермента IMPDH Дек. 24, 2002 США-6514997 Антипикорнавирусные соединения и композиции, их применение Фармацевтические Пользы, И Материалы Для Февраля. 4, 2003 их синтез US-6525043 использование модуляторов ионного канала Feb. 25, 2003 США-6531452 Антипикорнавирусные соединения и композиции, их применение Фармацевтические Пользы, И Материалы Для Мар. 11, 2003 их синтез US-6534489 фосфорорганические соединения и их применение Мар. 18, 2003 WO 00/06529 Дикетокислотные производные в качестве ингибиторов полимераз Feb. 10, 2000 WO 00/25791 пиридин-4-ил или пиримидин-4-Ил замещенные Пиразины 11 мая, 2000 WO 00/27423 способы и композиции для лечения симптомов обычной простуды могут 18, 2000 WO 00/34308 система трансдукции белка и способы ее применения Jun. 15, 2000 WO 00/39348 способы и композиции для идентификации модуляторов протеазы Июл. 6, 2000 WO 00/40243 новые соединения июл. 13, 2000 WO 00/50037 ингибиторы Нитрозированных и Нитрозилированных протонных насосов, Композиции И Способы Применения Aug. 31, 2000 WO 00/56331 ингибиторы фермента Impdh Сер. 28, 2000 WO 00/56757 иммуномодулирующие стероиды, в частности Гемигидрат 16.Альфа- Бромопиандростерон Сер. 28, 2000 WO 00/66096 новые показания к применению противоэпилептических средств и лекарственных средств Ноя. 9, 2000 WO 00/78746 противовирусные средства дек. 28, 2000 WO 01/00199 соединения, полученные из рода Salvia, обладающие противовирусной активностью Активность Ян. 4, 2001 WO 01/00585 Пиразолидинольные соединения янв. 4, 2001 WO 01/02551 вирусоподобные частицы, их получение и применение Предпочтительно В Фармацевтическом Скрининге Ян. 11, 2001 И Функциональная Геномика WO 01/03681 применение флавонов, кумаринов и родственных соединений для лечения Инфекции Ян. 18, 2001 WO 01/05396 применение хелатов кобальта для лечения или профилактики вируса Инфекция Ян. 25, 2001 WO 01/10894 Антипикорнавирусные соединения и композиции, их применение Фармацевтические Пользы, И Материалы Для Февраля. 15, 2001 их синтез WO 01/19322 использование Csaid при риновирусной инфекции Мар. 22, 2001 WO 01/19822 противовирусные средства Мар. 22, 2001 WO 01/22920 толстая кишка и рак толстой кишки ассоциированные полинуклеотиды и Полипептиды Апр. 5, 2001 WO 01/25188 новые карбаматы и мочевины Апр. 12, 2001 WO

01/31016 обработанные человеческие хемокины Phc-1 и Phc-2 Май 3, 2001 WO 01/37837 3,4-дигидро-(1H) - Хиназолин-2-оны и их применение в качестве Csbp / P38 Ингибиторы Киназы Май 31, 2001 WO 01/38312 3,4-дигидро-(1H)Хиназолин-2-он соединения в качестве киназы Csbp/P38 Ингибиторы 31 Мая 2001 Гола WO 01/38313 3,4-дигидро-(1H)Хиназолин-2-он соединения в качестве киназы Csbp/P39 Ингибиторы 31 Мая 2001 Гола WO 01/38314 3,4-дигидро-(1H)Хиназолин-2-он соединения в качестве киназы Csbp/P38 Ингибиторы 31 Мая 2001 Гола WO 01/40189 Антипикорнавирусные соединения и композиции, их применение Фармацевтические Пользы, И Материалы Для Джун. 7, 2001 их синтез WO 01/49303 Многовалентные электронные активные композиции и способы их получения И Используя Тот Же Джул. 12, 2001 WO 01/60393 селективное разрушение клеток, инфицированных человеком Вирус Иммунодефицита Aug. 23, 2001 Wo 01/62726 производные 2-Оксо-1-Пирролидина, способы их получения И Их Использование Aug. 30, 2001 WO 01/79167 Антипикорнавирусные соединения и композиции, их применение Фармацевтические Пользы, И Материалы Для Окт. 25, 2001 их синтез WO 01/90047 новые ингибиторы Mmp-2/Mmp-9 Nov. 29, 2001 WO 01/90129 профилактическое и терапевтическое лечение инфекционных и других заболеваний Заболевания С Моно - И Ноябрь. 29, 2001 Соединения На Основе Дисахаридов Wo 01/92499 молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие белок, взаимодействующий С Ser / Thr Kinase Akt Dec. 6, 2001 WO 01/93883 терапевтические средства-Iii дек. 13, 2001 WO 01/93884 терапевтические средства - I дек. 13, 2001 WO 01/93885 терапевтические средства-Ii дек. 13, 2001 WO 01/96297 Антипикорнавирусные соединения и композиции, их применение Фармацевтические Пользы, И Материалы Для Dec. 20, 2001 их синтез WO 02/04413 модуляторы хирального интегрина и способы их применения янв. 17, 2002 WO 02/11743 лечение рака предстательной железы февраль. 14, 2002 WO 02/12477 усиленная репликация РНК Hcv февраль. 14, 2002 WO 02/14343 иммуносупрессивные, противовоспалительные и анальгетические соединения Февраль. 21, 2002 WO 02/24145 противовирусные вещества из растений Кутикулярные и Эпикутикулярные Материал Mar. 28, 2002 WO 02/28351 рекомбинантные Муцинысвязывающие белки из *Streptococcus Pneumoniae* Apr. 11, 2002 WO 02/30442 способ лечения цитокин-опосредованного поражения печени АТР. 18, 2002 WO 02/34771 нуклеиновые кислоты и белки из группы стрептококков А & В май 2, 2002 WO 02/44737 диагностические и терапевтические композиции и способы, связанные с ними Рецептор, Связанный С Белком G Jun. 6, 2002 (Gpr) Рецептор Анафилатоксина С3а WO 02/50045 противовирусные средства Jun. 27, 2002 WO 02/51413 Макроциклические противовирусные соединения июл. 4, 2002 WO 02/53138 лечение для ингибирования неопластических поражений Jul. 11, 2002 WO 02/57425 Нуклеозидные производные в качестве ингибиторов РНК-зависимой РНК Вирусная Полимераза Jul. 25, 2002 WO 02/59083 новые соединения Aug. 1, 2002 WO 02/60875 Никотинамидные Биарильные производные, полезные в качестве ингибиторов Pde4 Изозимы Aug. 8, 2002 WO 02/60898 Тиазолил -, Оксазолил -, Пирролил- и Имидазолил-кислотный Амид Производные, Полезные В Качестве Ингибиторов Aug. 8, 2002 Изоферментов Pde4 Нуклеозиды WO 02/69903, их получение и применение в качестве ингибиторов РНК Вирусные Полимеразы Sep. 12, 2002 WO 02/72022 замещенные тетрациклиновые соединения в качестве противогрибковых агентов Sep.

19, 2002 Wo 02/72031 замещенные тетрациклиновые соединения в качестве Синергических противогрибковых средств Агенты Sep. 19, 2002 WO 02/76939 ингибиторы Цистеиновых протеаз окт. 3, 2002 WO 02/77021 белки и нуклеиновые кислоты *Streptococcus Pneumoniae* окт. 3, 2002 WO 02/79401 новые белковые связывающие взаимодействия Rgs9 и способы их применения Оного Окт. 10, 2002 WO 02/82041 производство и применение новых пептидных агентов для использования С Би-Специфические Антитела Окт. 17, 2002 WO 02/87465 композиции и способы двойного таргетирования вирусных инфекций И Раковые Клетки Ноя. 7, 2002 WO 02/87500 вирусные ферментативно активированные Протококофторы и их применение к Лечить Вирусные Инфекции Ноябрь. 7, 2002 WO 02/88091 ингибиторы риновирусной протеазы 2а цистеина человека Ноя. 7, 2002 WO 02/89832 фармацевтические композиции для профилактики или лечения Th1 и Th2-Клеточные Заболевания, Связанные С Ноя. 14, 2002 Модулирующие Соотношения Th1 / Th2. WO 02/92779 способ обогащения тканей в длинноцепочечном Полиненасыщенном виде Жирные Кислоты Ноябрь. 21, 2002 Конъюгаты WO 02/94185 и композиции для клеточной доставки Nov. 28, 2002 WO 02/94868 белки золотистого стафилококка и нуклеиновые кислоты Ноя. 28, 2002 WO 02/96867 ингибиторы протеинкиназы для лечения заболеваний Dec. 5, 2002 WO 02/98424 Роман Антиинфекции Dec. 12, 2002 WO 03/04489 композиции и способы ингибирования Пренилтрансфераз Янв.. 16, 2003 WO 03/08628 ферментативные пептидные конъюгаты нуклеиновых кислот янв. 30, 2003 WO 03/15744 микрочастицы хитина и их медицинское применение февраль. 27, 2003 Wo 03/20222 производные Диоксолана и Оксатиолана в качестве ингибиторов РНК-Зависимая РНК-Вирусная Полимераза Mar. 13, 2003 WO 03/20270 Оксадиазолил-Феноксикалилизоксазолы, их композиции и Методы Их Использование В Качестве Mar. 13, 2003 Антипикорнавирусные Средства WO 03/20271 Оксадиазолил-Феноксикалилизоксазолы, их композиции и Методы Их Использование В Качестве Mar. 13, 2003 Антипикорнавирусные Средства WO 03/20712 Оксадиазолил-Феноксикалилизоксазолы, их композиции и Методы Их Использование В Качестве Mar. 13, 2003 Антипикорнавирусные Средства WO 86/03412 усовершенствования, касающиеся контроля и профилактики лечения Риновирусных Инфекций Jun. 19, 1986 WO 86/03971 противовирусные средства июл. 17, 1986 WO 88/09669 Авирулентные микробы и используют их для Dec. 15, 1988 WO 92/03475 энтеровирусные пептиды Mar. 5, 1992 WO 92/22520 перорально активные противовирусные соединения Dec. 23, 1992 WO 92/22570 ингибиторы Пикорнавирусных протеаз Dec. 23, 1992 WO 94/00012 нуклеиновые кислоты и способы их применения для борьбы с вирусами Патогены Ян. 6, 1994 WO 95/03821 Прозапазин и производные цитокинов пептиды в качестве терапевтических агентов Февраль. 9, 1995 WO 95/09175 кольцо-расширенные нуклеозиды и нуклеотиды Arg. 6, 1995 WO 95/11992 противовирусные соединения 4 мая 1995 гола WO 95/31198 Тиадиазолы и их применение в качестве Антипикорнавирусных агентов Ноя. 23, 1995 WO 95/31438 терапевтические Феноксикалилизоксазолы Ноя. 23, 1995 WO 95/31439 терапевтические Феноксикалилизоксазолы и промежуточные продукты для их получения Ноя. 23, 1995 WO 95/31452 терапевтические Феноксикалилизоксазолы и Феноксикалилизоксазолы Ноя. 23, 1995 WO 95/34595 противовирусные дендримеры Dec. 21, 1995 WO 95/35103 А фармацевтическая композиция для профилактики и/или Лечение Вирусных Инфекций И Дек. 28, 1995 Необязательно Воспаления, А Также Способ Их Лечение WO 96/05836 методы лечения симптомов простуды с использованием пентоксифиллина Feb. 29, 1996 WO 96/05854 комбинированный препарат, содержащий циклоспорин А или Fk506, или Рапамидин И Ксантин Февраль. 29, 1996 Производное WO 96/09822 Антипикорнавирусные препараты апрель. 4, 1996 WO 96/11211 селективное ингибирование внутриклеточной трансляции РНК Apr. 18, 1996 WO 96/22689 многокомпонентные РНК-катализаторы и их применение Aug. 1, 1996 Производные Сульфонамида WO 96/40641 в качестве модуляторов клеточной адгезии Dec. 19, 1996 WO 97/08553 таргетирование белков на клеточную стенку грамположительных клеток Бактерии Mar. 6, 1997 WO 97/34566 Электрофильные кетоны для лечения герпеса Инфекции Sep. 25, 1997 WO 97/41137 применение Антоцианидина и производных Антоцианидина Ноя. 6, 1997 WO 97/43305 ингибиторы протеаз Пикорнавируса 3с и способы их получения Использование И Подготовка Ноя. 20, 1997 WO 97/47270 новые противовирусные соединения Dec. 18, 1997 WO 98/03572 антивирусные линейные полимеры янв. 29, 1998 Wo 98/07745 композиции и способы лечения инфекций с использованием Аналогов Индолицидина Feb. 26, 1998 WO 98/11778 противомикробное лечение вируса простого герпеса и других заболеваний Инфекционные Заболевания Mar. 26, 1998 WO 98/22495 соединения Антикинаина и их применение 28 мая 1998 гола WO 98/31363 противовирусные соединения июл. 23, 1998 WO 98/31374 способ лечения Риновирусных инфекций Jul. 23, 1998 WO 98/32427 терапевтическое лечение и профилактика инфекций с А Биоактивный Материал Инкапсулированный Джул. 30, 1998 Внутри Биоразлагаемо-Биосовместимой Полимерной Матрицы WO 98/34601 способ ингибирования внутриклеточной вирусной репликации Aug. 13, 1998 WO 98/42188 антимикробная профилактика и лечение человека Вирус Иммунодефицита И Другие Окт. 1, 1998 инфекционная патология WO 98/43950 Антипикорнавирусные композиции, композиции, содержащие их, и Способы Их Применения Окт. 8, 1998 WO 98/49190 замещенные Оксадиазольные Цистеиновые протеазы ингибиторы Ноя. 5, 1998 WO 98/55120 антивирусные соединения Dec. 10, 1998 Wo 99/30699 модуляторы Цистеиновой протеазы Jun. 24, 1999 WO 99/31122 Антипикорнавирусные соединения и способы их применения и Подготовка Jun. 24, 1999 WO 99/54317 ингибиторы Цистеиновых протеаз окт. 28, 1999 WO 99/55663 ингибиторы фермента Impdh Nov. 4, 1999 WO 99/57135 Антипикорнавирусные соединения, их получение и применение Ноя. 11, 1999 WO 99/59587 противовирусные соединения Ноя. 25, 1999 WO 99/61437 новые 2-Алкилзамещенные имидазольные соединения Dec. 2, 1999

[1661] ТАБЛИЦА-США-00066 Таблица 2 Патенты США и опубликованные международные патентные заявки Публикация Публикация Номер Название Дата Нуклеозиды WO 02/69903, их получение и применение в качестве ингибиторов РНК Вирусные Полимеразы Sep. 12, 2002 WO 02/48116 ингибиторы протеазы Ns3 вируса гепатита С Jun. 20, 2002 WO 02/48157 Имидазолидиноны и их родственные производные в качестве гепатита С Ингибиторы Протеазы Вируса Ns3 Jun. 20, 2002 WO 02/61048 In Vitro система для репликации РНК-зависимой РНК Полимеразы (RdRp) Вируса Aug. 8, 2002 WO 03/02518 новые производные 2,4-Дифторбензамида в качестве противовирусных агентов Янв.. 9, 2003 WO 02/79187 производные метокси-1,3,5-Триазина в качестве противовирусных агентов окт. 10, 2002 Wo 01/78648 производные 6-Метилникотинамида в качестве противовирусных агентов окт. 25, 2001 WO 01/12214 МИКОФЕНОЛАТ МОФЕТИЛ В АССОЦИАЦИИ С ПЭГ-ИФН-Альфа. Февраль. 22, 2001 WO 02/100415 4' - замещенные нуклеозиды Dec. 19, 2002 WO 02/18404 производные нуклеозидов Mar. 7, 2002 WO 02/94289 противовирусные Нуклеозидные производные Ноя. 28, 2002 WO 96/39500 олигонуклеотиды, специфичные для вируса гепатита С Dec. 12, 1996 WO 03/00713 Нуклеозидные соединения в Hcv Jan. 3, 2003 Аналоги нуклеозидов WO 01/60381 С модифицированным Карбоксамидном Бициклическим основанием Авг. 23, 2001 WO 02/03997 Пиридо[2,3-D] пиримидин и Пиримидо[4,5-D] пиримидин Нуклеозиды Ян. 17, 2002 Wo 97/26883 модуляция экспрессии цитокинов Th1 / Th2 с помощью Рибавирина3 и Аналоги Рибавирина3 В Июле. 31, 1997 Активированные Т-Лимфоциты WO 03/26589 способы и композиции для лечения вируса гепатита С С использованием 4' - Модифицированные Нуклеозиды Apr. 3, 2003 WO 03/26675 способы и композиции для лечения флавивирусов и Пестивирусы Используют 4' - Модифицированный Apr. 3, 2003 Нуклеозидный WO 97/30067 модифицированные сахаром Гапированные олигонуклеотиды Aug. 21, 1997 WO 01/47883 соединения с плавным кольцом и их применение в качестве лекарственных средств Jul. 5, 2001 WO 03/00254 плавные циклические соединения и их лекарственное применение янв. 3, 2003 WO 02/100354 Пирроло[2,3-D]пиримидин Нуклеозидные аналоги Dec. 19, 2002 WO 01/55111 Биарильные соединения, их получение и их

применение в терапии Авг. 2, 2001 WO 01/16149 2-Азапуриновые соединения и их применение Мар. 8, 2001 WO 01/85770 Sentinel Virus Ii Nov. 15, 2001 WO 02/12263 содержащие нуклеиновые кислоты связующие соединения Пиразола[3,4-D] Пиримидиновые Аналоги Пурина - Feb. 14, 2002 2,6-Диамин И Их Применение JP 2001-247550 A2 конденсированное кольцевое соединение и его лекарственное применение Sep. 11, 2001 6210675 PT-NANB гепатит полипептиды Apr. 3, 2001 6451991 Модифицированные Сахаром Гапированные Олигонуклеотиды Sep. 17, 2002 5830455 Способ Лечение С Использованием Терапевтической Комбинации .альфа.- Интерферон И Свободные Радикалы Ноя. 3, 1998 Уборщик мусора 5908621 Полиэтиленгликоль Модифицированная Интерферонотерапия Jun. 1, 1999 5990276 синтетические ингибиторы протеазы NS3 вируса гепатита С Ноя. 23, 1999 6172046 комбинированная терапия для устранения обнаруженной HCV-РНК у пациентов Имея Хронический Ян. 9, 2001 Инфекция Гепатита С 6177074 Полиэтиленгликоль Модифицированная Интерферонотерапия Янв. 23, 2001 6326137 Вирус Гепатита С Протеазозависимый Химерный Пестивирус Dec. 4, 2001 6434489 композиции полимеразы NS5В вируса гепатита С и способы их получения Кристаллизация Же Авг. 13, 2002 6461605 Непрерывная Инфузионная Терапия Низкими Дозами Цитокинов Окт. 8, 2002 6472373 комбинированная терапия для устранения обнаруженной HCV-РНК внутри Противовирусная Терапия Наивный Окт. 29, 2002 Пациенты, Имеющие Хроническую Инфекцию Гепатита С 6524570 Полиэтиленгликоль Модифицированная Интерфероновая Терапия Февраль. 25, 2003 WO 00/37097 Рибавирин-Интерферон альфа индукция HCV комбинированная терапия Ион. 29, 2000 WO 00/37110 Рибавирин-пегилированный интерферон альфа индукционная комбинация Hcv Терапия Jun. 29, 2000 WO 00/62799 комбинированная терапия ВГС, содержащая Рибавирин в Ассоциации С Антиоксидантами Окт. 26, 2000 WO 01/58929 Азапептиды, полезные при лечении гепатита С Aug. 16, 2001 WO 02/32414 Рибавирин-пегилированный интерферон альфа Hcv комбинированная терапия Apr. 25, 2002 WO 03/24461 HCV комбинированная терапия Мар. 27, 2003 WO 93/20835 лечение гепатита С GM-Csf окт. 28, 1993 WO 96/36702 растворимая, активная протеаза вируса гепатита С Ноя. 21, 1996 WO 97/16204 непрерывная инфузионная терапия низкими дозами цитокинов 9 мая 1997 года WO 97/43310 синтетические ингибиторы протеазы Ns3 вируса гепатита С Nov. 20, 1997 Конъюгаты Альфа-интерферона полиэтиленгликоля WO 98/48840 для терапии Инфекция Ноя. 5, 1998 Wo 99/15194 комбинированная терапия для искоренения обнаруженной Hcv-РНК в организме Пациенты, Имеющие Хронический Apr. 1, 1999 Инфекция Гепатита С WO 99/59621 комбинированная терапия, включающая Рибавирин и Интерферон альфа В Противовирусном Лечение Ноя. 25, 1999 Наивные Пациенты, Имеющие G Хроническую Инфекцию Гепатита С WO 02/100846 соединения и способы для лечения или профилактики Флавивирусные Инфекции Dec. 19, 2002 WO 02/100851 соединения и способы для лечения или профилактики Флавивирусные Инфекции Dec. 19, 2002 5241053 слитые белки, содержащие гликопротеин Gd ВПГ-1 и ЛТВ Aug. 31, 1993 5556946 Интерлейкин-2 / Вирусные Антигенные Белковые Химеры Sep. 17, 1996 6087484 Повышение Каталитической Активности Рибозима С Помощью 2' -О-Замещенного Ведущий Юл. 11, 2000 Олигонуклеотид 5830905 Соединения, Композиции И Способы Для Лечение Гепатита С Ноя. 3, 1998 6316492 Способы Лечение Или Профилактики Вирусных Инфекций И Связанные С Ними Болезни Ноя. 13, 2001 6440985 Способы Лечение Вирусных Инфекций Авг. 27, 2002 Wo 00/10573 соединения, композиции и способы для лечения или профилактики Вирусные Инфекции И Мар. 2, 2000 сопутствующее заболевание WO 00/13708 способы лечения или профилактики вирусных инфекций и Сопутствующие Заболевания Мар. 16, 2000 WO 00/18231 способы лечения или профилактики вирусных инфекций и Сопутствующие Заболевания Apr. 6, 2000 Wo 99/51781 вирус гепатита С NS5В композиции и способы их применения Окт. 14, 1999 6323180 Три-Пептиды Ингибитора Гепатита С Ноя. 27, 2001 6143715 Ингибитор Гепатита С Пептидные Аналоги Ноя. 7, 2000 6329379 Три-Пептиды Ингибитора Гепатита С Dec. 11, 2001 6329417 Три-Пептиды Ингибитора Гепатита С Dec. 11, 2001 6410531 Три-Пептиды Ингибитора Гепатита С Jun. 25, 2002 6420380 Три-Пептиды Ингибитора Гепатита С Jul. 16, 2002 6448281 Ингибиторы Вирусной Полимеразы Sep. 10, 2002 6479508 Ингибиторы Вирусных Полимераз Ноя. 12, 2002 6534523 Три-Пептиды Ингибитора Гепатита С Мар. 18, 2003 WO 00/09543 три-пептиды ингибитора гепатита С февраль. 24, 2000 WO 00/09558 пептиды ингибитора гепатита С февраль. 24, 2000 WO 00/59929 Макроциклические пептиды, активные против вируса гепатита С окт. 12, 2000 WO 02/04425 ингибиторы вирусной полимеразы Jan. 17, 2002 WO 02/70739 HCV Полимеразный ингибитор анализ Sep. 12, 2002 WO 03/07945 ингибиторы вирусной полимеразы Jan. 30, 2003 WO 03/10140 ингибиторы вирусных полимераз Feb. 6, 2003 WO 03/10141 ингибиторы вирусных полимераз Feb. 6, 2003 WO 99/07734 ингибитор гепатита С пептидные аналоги Feb. 18, 1999 WO 01/16379 ингибиторы репликации вируса гепатита С Мар. 8, 2001 WO 02/07761 ингибирование обработки и репликации вируса гепатита С янв. 31, 2002 Производные нуклеозидов WO 02/57287 в качестве ингибиторов РНК-зависимой РНК Вирусная Полимераза Jul. 25, 2002 Wo 02/57425 Нуклеозидные производные в качестве ингибиторов РНК-зависимой РНК Вирусная Полимераза Jul. 25, 2002 WO 02/70651 вирусные частицы репортера Sep. 12, 2002 Wo 03/20222 производные Диоксолаана и Оксотиолана в качестве ингибиторов РНК-Зависимой РНК-Вирусная Полимераза Мар. 13, 2003 PCT / US2003 / Тиосемикарбазоны как противовирусные и Иммунопотенциаторы Jan. 10, 2003 041493

[1662] ТАБЛИЦА-США-00067 Таблица 3 Патенты США и опубликованные международные патентные заявки, касающиеся ингаляций технология доставки противовирусных соединений по изобретению. Публикация Публикация Номер Название Дата 5740794 аппарат и способы диспергирования сухих порошковых лекарственных средств апр. 21, 1998 5775320 способ и устройство для доставки аэрозольных лекарственных средств июл. 7, 1998 5785049 способ и устройство для диспергирования сухих порошковых лекарственных средств июл. 28, 1998 5814607 легочная доставка активных фрагментов паратиреоидного гормона Sep. 29, 1998 5826633 системы, аппараты и способы наполнения порошков окт. 27, 1998 5458135 способ и устройство для доставки аэрозольных лекарственных средств окт. 17, 1995 5607915 легочная доставка активных фрагментов паратиреоидного гормона Мар. 4, 1997 5654007 способы и системы для обработки диспергируемых тонкодисперсных порошков авг. 5, 1997 5922354 способы и система для обработки диспергируемых тонкодисперсных порошков Jul. 13, 1999 5928469 способ хранения материалов июл. 27, 1999 5976574 процессы распылительной сушки гидрофобных препаратов в органическом растворителе суспензии Ноя. 2, 1999 5985248 процессы распылительной сушки растворов гидрофобных лекарственных средств и композиции из них Nov. 16, 1999 5994314 композиции и способы доставки нуклеиновой кислоты в легкое Ноя. 30, 1999 5997848 способы и композиции для легочной доставки инсулина Dec. 7, 1999 6001336 процессы распылительной сушки водных суспензий гидрофобных лекарственных средств и их композиции Dec. 14, 1999 6019968 диспергируемые композиции антител и способы их получения подготовка и использование февраля. 1, 2000 6051256 диспергируемые макромолекулярные композиции и способы их получения подготовка и использование Apr. 18, 2000 6071428 стабильные композиции Jun. 6, 2000 6077543 системы и способы для распылительной сушки гидрофобных лекарственных средств с гидрофильные вспомогательные вещества Jun. 20, 2000 6080721 легочная доставка активных фрагментов паратиреоидного гормона Jun. 27, 2000 6089228 аппарат и способы для диспергирования сухих порошковых лекарственных средств июль. 18, 2000 6103270 способы и система для обработки диспергируемых тонкодисперсных порошков авг. 15, 2000 6123936 способы и композиции для получения сухого порошкового состава интерфероны Sep. 26, 2000 6136346 улучшенные порошкообразные фармацевтические композиции диспергируемость окт. 24, 2000 6138668 способ и устройство для доставки аэрозольных лекарственных средств окт. 31, 2000 6165463 диспергируемые антителные композиции и способы их получения подготовка и использование Dec. 26, 2000 6182712 силовые запорочные устройства и способы их применения февраль. 6, 2001 6187344 улучшенные порошкообразные фармацевтические композиции диспергируемость Feb. 13, 2001 6207135 газовые микрочастицы для ультразвуковой диагностики и способ их получения их производство Мар. 27, 2001 6231851 способы и композиции для получения сухого порошкового состава интерфероны 15 мая 2001 года 6257233 аппараты для сухого диспергирования порошка и способы их применения июль. 10, 2001 6258341 стабилизированные стекловидные государственные образования порошка Джул. 10, 2001 6267155 системы, аппараты и способы наполнения порошков июл. 31, 2001 6294204 способ получения морфологически однородных микрокапсул и микрокапсулы, производимые Sep. 25, 2001 этот метод 6303582 композиции и способы доставки нуклеиновой кислоты в легкое Окт. 16, 2001 6309623 стабилизированные препараты для применения в дозированных ингаляторах окт. 30, 2001 Стабилизированные стекловидные государственные образования порошка окт. 30, 2001 6358530 улучшенные порошкообразные фармацевтические композиции диспергируемость Мар. 19, 2002 6365190 системы и способы для распылительной сушки гидрофобных лекарственных средств с использованием гидрофильные вспомогательные вещества апр. 2, 2002 6372258 способы распылительной сушки лекарственного средства и гидрофобной аминокислоты апр. 16, 2002 6423344 диспергируемые макромолекулярные композиции и способы их получения подготовка и использование июл. 23, 2002 6426210 хранение материалов июль. 30, 2002 6433040 стабилизированные биологически активные препараты и способы их применения авг. 13, 2002 6440337 способ и устройство для образования частиц Aug. 27, 2002 RE37872 хранение материалов окт. 8, 2002 6479049 способы и композиции для получения сухого порошкового состава интерфероны Ноя. 12, 2002 6503411 стабильные композиции Ян. 7, 2003 6509006 устройства композиции и способы для легочного родоразрешения аэрозольные лекарства Ян. 21, 2003 6514496 диспергируемые композиции антител и способы их получения подготовка и использование февраля. 4, 2003 6518239 сухие порошковые композиции, обладающие улучшенной дисперсностью Feb. 11, 2003 6543448 аппарат и способы для диспергирования сухих порошковых лекарственных средств апр. 8, 2003 6546929 аппараты для сухого диспергирования порошка и способы их применения апр. 15, 2003 WO 00/15262 сухой порошок активный агент легочная доставка Мар. 23, 2000 WO 93/00951 способ и устройство для доставки аэрозольных лекарственных средств Jan. 21, 1993 WO 94/07514 легочная доставка активных фрагментов паратиреоидного гормона Apr. 14, 1994 WO 95/24183 способы и композиции для легочной доставки инсулина Сен. 14, 1995 WO 95/31479 способы и композиции для получения сухого порошкового состава интерфероны Ноя. 23, 1995 Аппарат WO 96/09085 и способы диспергирования сухих порошковых лекарственных средств Мар. 28, 1996 WO 96/32096 улучшенные порошкообразные фармацевтические композиции диспергируемость окт. 17, 1996 Wo 96/32116 композиции и способы доставки нуклеиновой кислоты в легкое Окт. 17, 1996 WO 96/32149 легочная доставка аэрозольных лекарственных средств окт. 17, 1996 WO 96/32152 легочное введение сухого порошка альфа-1-антитрипсина Окт. 17, 1996 WO 96/40068 способы и система для обработки диспергируемых тонкодисперсных порошков Дек. 19, 1996 WO 97/41031 системы, аппараты и способы наполнения порошков Ноя. 6, 1997 Композиции диспергируемых

макромолекул WO 97/41833 и способы их получения подготовка и использование Ноя. 13, 1997 Во 98/16205 стабилизированные стекловидные государственные образования порошка апр. 23, 1998 WO 98/29096 аэрозольное гидрофобное лекарственное средство июл. 9, 1998 WO 98/29098 процессы распылительной сушки водных суспензий гидрофобных препараты с гидрофильным Джулом. 9, 1998 вспомогательные вещества и композиции, полученные такими способами WO 98/29140 процессы и композиции для распылительной сушки гидрофобных лекарственных средств в суспензиях органических растворителей Jul. 9, 1998 гидрофильных наполнителей WO 98/29141 процессы распылительной сушки растворов гидрофобных лекарственных средств с гидрофильные вспомогательные вещества и Jul. 9, 1998 композиции, полученные такими способами Прибор и метод завалки порошка WO 99/19215 Apr. 22, 1999 WO 99/42124 жидкокристаллические формы циклоспорина Aug. 26, 1999 WO 99/47196 доставка аэрозольного активного вещества Sep. 23, 1999 WO 99/62495 аппарат для диспергирования сухих порошков и способы их применения Dec. 9, 1999 WO 00/21594 подача активного агента модулированного сопротивлением потока аэрозольная Апр. 20, 2000 WO 00/61178 легочное введение сухих порошковых составов для лечение бесплодия окт. 19, 2000 WO 00/72904 устройство и Способ дозирования дозированного количества аэрозольный препарат дек. 7, 2000 WO 01/00263 системы и способы аэроолизации фармацевтических препаратов формулировки Ян. 4, 2001 WO 01/00312 распылительная сушка для получения сухих порошков Jan. 4, 2001 WO 01/32144 сухие порошковые композиции, обладающие улучшенной дисперсностью 10 мая, 2001 Wo 01/43529 сосуды для облегчения извлечения порошков Jun. 21, 2001 WO 01/43530 системы и способы извлечения порошков из емкостей Июнь. 21, 2001 WO 01/43802 системы и способы обработки упакованных порошков Jun. 21, 2001 WO 01/44764 системы и методы неразрушающего зондирования масс Jun. 21, 2001 WO 01/87393 системы, устройства и способы для открытия сосудов, имеющих а порошок, котор нужно флюидизировать Nov. 22, 2001 WO 01/93932 механизм блокировки для устройств доставки аэрозольных лекарственных средств Dec. 13, 2001 WO 02/09669 аппарат и способ получения частиц, имеющих узкую форму распределение по размерам и частицам сделало февраль. 7, 2002 тем самым WO 02/11695 ингаляционный спрей высушил 4-спиральный пучок белковых порошков, имеющих минимизированная агрегация Feb. 14, 2002 Способ индуцированного фазового перехода WO 02/49619 для получения микрочастицы, содержащие гидрофильные Jun. 27, 2002 активный агент Способ индуцированного фазового перехода WO 02/49620 для получения микрочастицы, содержащие гидрофобные Jun. 27, 2002 активный агент WO 02/54868 легочная доставка полиеновых противогрибковых средств июл. 18, 2002 WO 02/87542 новые способы и композиции для доставки макромолекул до или через дыхательные пути Nov. 7, 2002 WO 02/100548 центрифугировало вращая барабанчик для обрабатывать кохезионные порошки Dec. 19, 2002 WO 03/00326 аппарат и способ аэроолизации порошка янв. 3, 2003 Регулятор расхода WO 03/00329 для устройства и способов доставки аэрозольных лекарственных средств Янв.. 3, 2003

[1663] ТАБЛИЦА-США-00068 Таблица 4 Прямой и обратный праймеры для амплификации нуклеиновых кислот SARSV Для- Передний подпочечный обратный Prim-Prod-Opti- Пара праймер вперед Prim-форвард праймер обратный обратный обратный Обратный er Prod-uct An-num Numb-SEQ Primer Primer er Primer SEQ Primer Primer Primer Primer Tm Продукт уст % Neal отжиг er ID нет Start Stop Tm % GC ID нет Start Stop Tm % GC Diff длина Tm GC Оценка Темп 1 1021 12726 12746 51.3 47.6 3521 12996 12977 50.2 40 1 271 75 42.8 26 52.6 2 1022 12236 12256 51.2 42.9 3522 12993 12975 51.4 47.4 0.2 758 76.4 42.5 26 54 3 1023 12373 12391 50.8 47.4 3523 12993 12975 51.4 47.4 0.6 621 76.4 43 26 53.8 4 1024 12236 12256 51.2 42.9 3524 12996 12977 50.2 40 0.9 761 76.4 42.3 26 53.6 5 1025 12373 12391 50.8 47.4 3525 12996 12977 50.2 40 0.5 624 76.4 42.8 26 53.6 6 1026 12726 12746 51.3 47.6 3526 12993 12975 51.4 47.4 0.1 268 75.1 43.3 26 53.1 7 1027 2671 2692 52.1 40.9 3527 3185 3164 51 45.5 1.2 515 75.6 41.6 26 53.3 8 1028 28942 28961 50.2 45 3528 29298 29280 51.4 52.6 1.2 357 76.4 44.8 26 53.6 9 1029 19801 19819 53.2 52.6 3529 19922 19901 51.5 45.5 1.7 122 72.2 43.4 26 51.1 10 1030 19800 19817 50.4 50 3530 19921 19901 50.2 47.6 0.3 122 72.2 43.4 26 50.7 11 1031 9930 9948 51.5 52.6 3531 10605 10588 51.1 50 0.4 676 75.8 41.3 27 53.5 12 1032 9933 9952 50.9 45 3532 10605 10588 51.1 50 0.2 673 75.8 41.2 27 53.4 13 1033 9930 9949 52.2 50 3533 10605 10588 51.1 50 1.1 676 75.8 41.3 27 53.5 14 1034 9927 9945 50.8 52.6 3534 10605 10588 51.1 50 0.3 679 75.8 41.2 28 53.4 15 1035 3789 3806 50 50 3535 4445 4425 50.6 42.9 0.5 657 75.5 40.5 28 52.9 16 1036 3788 3805 50 50 3536 4444 4424 50.6 42.9 0.5 657 75.5 40.5 28 52.9 17 1037 3795 3813 52.1 52.6 3537 4445 4425 50.6 42.9 0.5 657 75.5 40.5 28 52.9 18 1038 3787 3804 50 50 3538 4445 4425 50.6 42.9 0.5 659 75.4 40.4 28 52.9 19 1039 19801 19819 53.2 52.6 3539 19921 19900 51.8 45.5 1.4 121 72.3 43.8 28 51.2 20 1040 24418 24436 50 47.4 3540 25182 25164 51.4 47.4 1.4 765 76.1 41.7 28 53.4 21 1041 9929 9949 53.8 47.6 3541 10449 10425 54.6 40 0.8 521 75.4 40.9 28 54 22 1042 2671 2692 52.1 40.9 3542 3186 3165 50.4 40.9 1.7 516 75.6 41.5 28 53.1 23 1043 3792 3810 52.9 52.6 3543 4446 4425 51.8 45.5 1.1 655 75.5 40.6 28 53.5 24 1044 9933 9952 50.9 45 3544 10449 10425 51.9 40.9 1.1 517 75.3 40.8 28 53.1 25 1045 3792 3810 52.9 52.6 3545 4445 4424 51.3 40.9 1.6 654 75.5 40.5 28 53.3 26 1046 25782 25806 53.5 40 3546 26184 26164 52.4 42.9 1.1 403 74.7 40.2 28 53.1 27 1047 9927 9945 50.8 52.6 3547 10449 10431 50.9 47.4 0.1 523 75.4 40.9 28 53.1 28 1048 9927 9945 50.8 52.6 3548 10449 10428 51.9 40.9 1.1 523 75.4 40.9 28 53.1 29 1049 3789 3806 50 50 3549 4444 4424 50.6 42.9 0.5 656 75.5 40.5 28 53 30 1050 3795 3813 52.1 52.6 3550 4444 4424 50.6 42.9 1.5 650 75.5 40.6 28 53.1 31 1051 9933 9952 50.9 45 3551 10449 10428 51.9 40.9 1.1 517 75.3 40.8 28 53.1 32 1052 9930 9948 51.5 52.6 3552 10449 10431 50.9 47.4 0.5 520 75.4 41 28 53.2 33 1053 9930 9948 51.5 52.6 3553 10449 10428 51.9 40.9 1.4 520 75.4 41 28 53.3 34 1054 9929 9948 53.2 50 3554 10449 10425 54.6 40 1.4 521 75.4 40.9 28 53.8 35 1055 9931 9952 53 45.5 3555 10449 10425 54.6 40 1.6 519 75.3 40.8 28 53.7 36 1056 3791 3808 50 50 3556 4445 4425 50.6 42.9 0.5 655 75.5 40.5 28 52.9 37 1057 3791 3808 50 50 3557 4444 4424 50.6 42.9 0.5 654 75.5 40.5 28 53 38 1058 9930 9949 52.2 50 3558 10449 10431 50.9 47.4 1.2 520 75.4 41 28 53.2 39 1059 9930 9949 52.2 50 3559 10449 10428 51.9 40.9 0.3 520 75.4 41 28 53.5 40 1060 3788 3805 50 50 3560 4444 4425 50.6 42.9 0.5 658 75.5 40.4 28 52.9 41 1061 19800 19817 50.4 50 3561 19921 19900 51.8 45.5 1.4 122 72.2 43.4 28 50.8 42 1062 3787 3804 50 50 3562 4444 4424 50.6 42.9 0.5 658 75.5 40.4 28 52.9 43 1063 25782 25806 53.5 40 3563 26183 26163 51.7 42.9 1.7 402 74.7 40.3 28 52.9 44 1064 25782 25806 53.5 40 3564 26183 26160 54.5 41.7 1 402 74.7 40.3 28 53.5 45 1065 25782 25806 53.5 40 3565 26183 26159 54.9 40 1.5 402 74.7 40.3 28 53.5 46 1066 2429 2447 50.2 47.4 3566 3187 3166 50.3 45.5 0.1 759 76.6 43 29 53.8 47 1067 2427 2445 52.1 52.6 3567 3185 3164 51 45.5 1.1 759 76.7 43.1 29 54.1 48 1068 2429 2447 50.2 47.4 3568 3185 3164 51 45.5 0.7 757 76.6 42.9 29 53.8 49 1069 19800 19817 50.4 50 3569 19923 19904 50.1 50 0.3 124 72.3 43.5 29 50.8 50 1070 2427 2445 52.1 52.6 3570 3187 3166 50.3 45.5 1.8 761 76.7 43.1 29 53.9 51 1071 29183 29204 50.4 40.9 3571 29412 29393 50.3 45 0 230 75.3 44.8 29 52.9 52 1072 16367 16386 51.4 50 3572 16780 16760 51.4 42.9 0.1 414 75 40.8 30 53 53 1073 11543 11562 50.4 40 3573 12254 12236 50.5 47.4 0.1 712 76.2 42 30 53.6 54 1074 12976 12995 51.1 45 3574 13547 13528 50.2 45 0.9 572 77.4 45.5 30 54.3 55 1075 12040 12057 50.6 50 3575 12254 12236 50.5 47.4 0.1 215 75.5 45.6 30 53.1 56 1076 12976 12996 51.8 42.9 3576 13544 13525 52.6 55 0.8 569 77.5 45.7 30 54.8 57 1077 10141 10160 51 45 3577 10605 10588 51.1 50 0.1 465 74.9 40.2 30 52.8 58 1078 12235 12253 50.1 52.6 3578 12996 12977 50.2 40 0.1 762 76.4 42.4 30 53.6 59 1079 19795 19814 50.4 45 3579 19921 19901 50.2 47.6 0.3 127 72.3 43.3 30 50.8 60 1080 12235 12253 50.1 52.6 3580 12993 12975 51.4 47.4 1.3 759 76.5 42.6 30 53.7 61 1081 12976 12994 50.3 47.4 3581 13547 13528 50.2 45 0.1 572 77.4 45.5 30 54.3 62 1082 12975 12994 52.1 45 3582 13544 13525 52.6 55 0.5 570 77.4 45.6 30 54.9 63 1083 12977 12996 50.2 40 3583 13547 13528 50.2 45 0.1 572 77.4 45.5 30 54.3 64 1084 11541 11561 50.9 42.9 3584 12254 12236 50.5 47.4 0.3 714 76.2 42 30 53.6 65 1085 28394 28411 50.3 50 3585 28672 28654 50.6 52.6 0.3 279 78.6 51.6 30 55.2 66 1086 9930 9948 51.5 52.6 3586 10455 10434 51.1 40.9 0.3 526 75.3 40.7 30 53.1 67 1087 8220 8238 51.5 47.4 3587 8929 8911 53.4 52.6 1.9 710 75.4 40 30 53.3 68 1088 9930 9949 52.2 50 3588 10455 10435 50.5 42.9 1.7 526 75.3 40.7 30 52.9 69 1089 12236 12256 51.2 42.9 3589 12412 12392 50 42.9 1.2 177 73 41.2 30 51.2 70 1090 9930 9949 52.2 50 3590 10455 10434 51.1 40.9 1.1 526 75.3 40.7 30 53.1 71 1091 9933 9952 50.9 45 3591 10455 10435 50.5 42.9 0.4 523 75.2 40.5 30 52.9 72 1092 12726 12746 51.3 47.6 3592 13314 13297 51 50 0.3 589 76.6 43.6 30 54 73 1093 9933 9952 50.9 45 3593 10455 10434 51.1 40.9 0.3 523 75.2 40.5 30 53 74 1094 16909 16928 50.8 45 3594 17501 17481 51.2 42.9 0.4 593 75.9 41.8 30 53.5 75 1095 12975 12993 51.4 47.4 3595 13544 13525 52.6 55 1.2 570 77.4 45.6 30 54.7 76 1096 2671 2692 52.1 40.9 3596 3187 3166 50.3 45.5 1.8 517 75.6 41.6 30 53.1 77 1097 19800 19818 52.1 52.6 3597 19921 19900 51.8 45.5 0.3 122 72.2 43.4 30 51.2 78 1098 12975 12993 51.4 47.4 3598 13547 13528 50.2 45 1.2 573 77.3 45.4 30 54.3 79 1099 9930 9948 51.5 52.6 3599 10455 10435 50.5 42.9 1 526 75.3 40.7 30 52.9 80 1100 12976 12995 51.1 45 3600 13544 13525 52.6 55 1.5 569 77.5 45.7 30 54.6 81 1101 24635 24653 50.5 52.6 3601 25182 25164 51.4 47.4 0.9 548 75.1 40.1 30 52.8 82 1102 24633 24651 50.1 52.6 3602 25182 25164 51.4 47.4 1.3 550 75.2 40.2 30 52.7 83 1103 24630 24648 50.8 52.6 3603 25182 25164 51.4 47.4 0.6 553 75.2 40.3 30 53 84 1104 28394 28412 51.1 47.4 3604 28672 28654 50.6 52.6 0.5 279 78.6 51.6 30 55.3 85 1105 28395 28413 50.2 42.1 3605 28672 28654 50.6 52.6 0.4 278 78.6 51.4 30 55.2 86 1106 28396 28415 51.2 45 3606 28672 28654 50.6 52.6 0.6 277 78.6 51.6 30 55.3 87 1107 26421 26441 51.5 42.9 3607 26587 26568 52.7 45 1.2 167 72.3 40.1 30 51.2 88 1108 26421 26441 51.5 42.9 3608 26589 26571 51.7 47.4 0.2 169 72.4 40.2 30 51.2 89 1109 26421 26441 51.5 42.9 3609 26589 26572 51 50 0.5 169 72.4 40.2 30 51.1 90 1110 26421 26441 51.5 42.9 3610 26590 26573 51.7 50 0.3 170 72.3 40 30 51.2 91 1111 26040 26061 56.4 54.5 3611 26589 26568 55.2 45.5 1.2 550 75.1 40 30 54.2 92 1112 26039 26057 52.6 52.6 3612 26183 26160 54.5 41.7 1.9 145 71.9 40 30 51.2 93 1113 26039 26057 52.6 52.6 3613 26182 26161 51.2 40.9 1.4 144 71.7 40.3 30 50.7 94 1114 26039 26057 52.6 52.6 3614 26183 26163 51.7 42.9 0.9 145 71.9 40 30 51.2 95 1115 8867 8887 52.3 47.6 3615 9253 9235 51.6 47.4 0.7 387 75.1 41.3 30 53.2 96 1116 10247 10267 50.5 47.6 3616 10605 10588 51.1 50 0.6 359 74.6 40.4 30 52.4 97 1117 11540 11557 50.4 50 3617 12254 12236 50.5 47.4 0.1 715 76.2 42.1 30 53.6 98 1118 11541 11560 50.1 45 3618 12254 12236 50.5 47.4 0.4 714 76.2 42 30 53.5 99 1119 8221 8240 52.4 50 3619 8929 8911 53.4 52.6 1 709 75.4 40 30 53.6 100 1120 13039 13057 51.1 52.6 3620 13177 13156 50.4 40.9 0.7 139 73.9 46 31 52 101 1121 19801 19819 53.2 52.6 3621 19917 19895 52.5 43.5 0.8 117 72 43.6 31 51.2 102 1122 19709 19730 51.3 40.9 3622 19921 19900 51.8 45.5 0.5 213 73.9 41.8 31 52.2 103 1123 16366 16386 54.4 52.4 3623 16774 16751 53.6 41.7 0.8 409 75.1 41.1 31 53.8 104 1124 31 53.4 52.6 3624 256 235 52.6 45 0.8 254 76.1 46.1 31 54.2 105 1125 4 22 52.3 52.6 3625 314 296 50.6 47.4 1.7 311 76.8 46.6 31 54.1 106 1126 13039 13058 51.8 50 3626 13177 13156 50.4 40.9 1.5 139 73.9 46 31 52 107 1127 19800 19817 50.4 50 3627 19916 19895 50.2 40.9 0.2 117 71.7 42.7 31 50.3 108 1128 4645 4665 50.2 42.9 3628 5306 5289 50.8 50 0.5 662 75.6 40.8 31 53.1 109 1129 13039 13057 51.1 52.6 3629 13747 13726 50.8 40.9 0.4 709 76.6 43.2 31 54 110 1130 13039 13058 51.8 50 3630 13747 13726 50.8 40.9 1.1 709 76.6 43.2 31 54 111 1131 31 53.4 52.6 3631 253 233 51.8 47.6 1.6 251 76.2 46.2 31 54 112 1132 27365 27385 53.2 47.6 3632 27464 27444 53 42.9 0.2 100 70.8 43 31 50.6 113 1133 24418 24436 50 47.4 3633 24527 24508 50.5 45 0.5 110 71.3 42.7 31 50 114 1134 26708 26727 50 45 3634 27463 27446 50 44.4 0 756 75.9 41.1 31 53.2 115 1135 24179 24200 53.3 40.9 3635 24936 24919 51.8 50 1.5 758 75.8 41 31 53.7 116 1136 26708 26727 50 45 3636 27462 27444 50.1 42.1 0.1 755 75.9 41.2 31 53.2 117 1137 26708 26731 54.2 41.7

12975 51.4 47.4 0.2 761 76.5 42.6 34 54 278 1298 3033 3053 51.7 47.6 3798 3650 3631 53.1 50 1.4 618 76.4 42.9 34 54.1 279 1299 12233 12251 51.1 52.6 3799 12996 12977 50.2 40 0.9 764 76.4 42.4 34 53.7 280 1300 24483 24503 51 42.9 3800 24938 24921 50.4 50 0.6 456 75.6 41.9 34 53.1 281 1301 11541 11561 50.9 42.9 3801 12253 12235 50.1 52.6 0.8 713 76.2 42.1 34 53.5 282 1302 24622 24643 57.1 54.5 3802 25400 25379 56 50 1.1 779 75.7 40.7 34 54.9 283 1303 24622 24643 57.1 54.5 3803 25400 25378 56.4 47.8 0.6 779 75.7 40.7 34 55 284 1304 24630 24648 50.8 52.6 3804 25403 25385 51.1 47.4 0.3 774 75.7 40.6 34 53.3 285 1305 9929 9946 50 50 3805 10605 10588 51.1 50 1 677 75.8 41.2 34 53.2 286 1306 24633 24651 50.1 52.6 3806 25403 25385 51.1 47.4 1 771 75.6 40.5 34 53.1 287 1307 11541 11560 50.1 45 3807 12253 12235 50.1 52.6 0 713 76.2 42.1 34 53.5 288 1308 24635 24653 50.5 52.6 3808 25403 25385 51.1 47.4 0.7 769 75.6 40.4 34 53.2 289 1309 9933 9952 50.9 45 3809 10608 10589 51 50 0.1 676 75.8 41.1 34 53.4 290 1310 24921 24938 50.4 50 3810 25548 25531 51.1 50 0.7 628 75.6 40.9 34 53.1 291 1311 7725 7743 50.8 47.4 3811 8188 8169 50.5 45 0.4 464 75.6 41.8 34 53.2 292 1312 28547 28568 53.5 45.5 3812 29301 29282 51.1 47.4 0.7 769 75.6 40.4 34 53.2 293 1313 28547 28568 53.5 45.5 3813 29306 29288 53.5 52.6 0 713 76.2 42.1 34 53.5 294 1314 28548 28568 50.5 42.9 3814 29298 29280 51.4 52.6 0.9 751 78.4 47.4 34 55.2 295 1315 28546 28567 55.1 50 3815 29301 29282 55.3 55 0.2 756 78.5 47.6 34 56.6 296 1316 28547 28567 52.9 47.6 3816 29298 29280 51.4 52.6 1.5 752 78.5 47.5 34 55.5 297 1317 28546 28565 52.2 50 3817 29298 29280 51.4 52.6 0.8 753 78.5 47.5 34 55.5 298 1318 28546 28565 52.2 50 3818 29306 29288 53.5 52.6 1.3 761 78.5 47.6 34 55.7 299 1319 28396 28416 52.4 47.6 3819 28672 28654 50.6 52.6 1.8 277 78.6 51.6 34 55.3 300 1320 28396 28415 51.2 45 3820 28671 28652 51.7 52.6 3828 8049 8032 50.4 50 1.3 322 74.9 41.6 34 52.6 309 1329 28394 28412 51.1 47.4 3829 28671 28652 52.8 55 1.7 278 78.6 51.4 34 55.4 310 1330 28394 28412 51.1 47.4 3830 28671 28653 50.2 52.6 0.8 278 78.6 51.4 34 55.2 311 1331 11543 11562 50.4 40 3831 12257 12237 51.3 47.6 0.9 715 76.2 42 34 53.5 312 1332 28393 28411 52.9 52.6 3832 28671 28652 52.8 55 0.1 279 78.6 51.6 34 56 313 1333 28394 28411 50.3 50 3833 28671 28653 50.2 52.6 0 278 78.6 51.4 34 55.2 314 1334 4255 4276 51.7 45.5 3834 4710 4691 50.2 45 1.5 456 75.1 40.8 34 52.8 315 1335 12975 12994 52.1 45 3835 13545 13526 52.9 55 0.8 571 77.4 45.5 34 54.9 316 1336 9930 9948 51.5 52.6 3836 10608 10589 51 50 0.5 679 75.8 41.2 34 55.3 317 1337 27665 27686 51.4 40.9 3837 28411 28393 52.9 52.6 1.6 747 76.8 43.5 34 54.3 318 1338 27665 27686 51.4 40.9 3838 28415 28396 51.2 45 0.2 751 76.8 43.4 34 54.2 319 1339 11541 11561 50.9 42.9 3839 12257 12237 51.3 47.6 0.5 717 76.2 42 34 53.7 320 1340 27665 27685 50.7 42.9 3840 28415 28396 51.2 45 0.5 751 76.8 43.4 34 54.1 321 1341 11543 11562 50.4 40 3841 12253 12235 50.1 52.6 0.3 711 76.2 42.1 34 53.5 322 1342 11545 11563 50.8 47.4 3842 12254 12236 50.5 47.4 0.2 710 76.2 42.1 34 53.6 323 1343 27436 27455 52.7 45 3843 27542 27522 50.9 42.9 1.8 107 72 44.9 34 50.8 324 1344 27436 27455 52.7 45 3844 27546 27527 51.3 50 1.3 111 72.7 45.9 34 51.4 325 1345 27389 27407 50.6 47.4 3845 27541 27522 50.1 45 0.5 153 73.2 43.1 34 51.4 326 1346 27389 27407 50.6 47.4 3846 27546 27527 51.3 50 0.7 158 73.5 43.7 34 51.8 327 1347 27369 27392 57.2 50 3847 27468 27446 57.7 47.8 0.5 100 71.2 44 34 52.1 328 1348 27367 27389 55 47.8 3848 27466 27446 56.8 52.4 1.8 100 71.6 45 34 51.7 329 1349 11541 11560 50.1 45 3849 12257 12237 51.3 47.6 1.2 717 76.2 42 34 53.5 330 1350 7725 7742 50 50 3850 8188 8169 50.5 45 0.4 464 75.6 41.8 34 53.1 331 1351 2223 2243 50.2 42.9 3851 2672 2653 51.6 50 1.4 450 77 34 54.1 332 1352 9930 9949 52.2 50 3852 10608 10589 51 50 1.2 679 75.8 41.2 34 53.5 333 1353 9934 9953 50.7 50 3853 10455 10435 50.5 42.9 0.3 522 75.3 40.6 34 52.9 334 1354 2223 2243 50.2 42.9 3854 2672 2654 50.9 52.6 0.7 450 77 45.3 34 54.1 335 1355 3797 3815 50.9 47.4 3855 4445 4425 50.6 42.9 0.4 649 75.4 40.4 34 53.1 336 1356 9934 9953 50.7 50 3856 10455 10434 51.1 40.9 0.4 522 75.3 40.6 34 53 337 1357 18074 18093 50.3 45 3857 18697 18679 51.9 52.6 1.5 624 76.2 42.5 34 53.6 338 1358 12976 12994 50.3 47.4 3858 13545 13527 50.3 52.6 0.1 570 77.4 45.6 34 54.4 339 1359 12040 12057 50.6 50 3859 12498 12480 50 47.4 0.6 459 76.3 43.6 34 53.5 340 1360 12040 12057 50.6 50 3860 12257 12237 51.3 47.6 0.7 218 75.4 45.4 34 53.1 341 1361 11540 11557 50.4 50 3861 12257 12237 51.3 47.6 0.9 718 76.2 42.1 34 53.6 342 1362 12975 12993 51.4 47.4 3862 13545 13526 52.9 55 1.5 571 77.4 45.5 34 54.7 343 1363 12975 12993 51.4 47.4 3863 13545 13527 50.3 52.6 1.1 571 77.4 45.5 34 54.4 344 1364 11540 11560 53.2 47.6 3864 11965 53 52.6 0.2 444 75.1 40.8 34 53.6 345 1365 12040 12057 50.6 50 3865 12253 12235 50.1 52.6 0.5 214 75.5 45.4 34 53 346 1366 12976 12995 51.1 45 3866 13545 13526 52.9 55 1.8 570 77.4 45.6 34 54.6 347 1367 13039 13057 51.1 52.6 3867 13314 13297 51 50 0.1 276 75.7 44.6 34 53.4 348 1368 27361 27380 52.4 55 3868 27463 27444 51.6 40 0.8 103 71.7 44.7 34 50.7 349 1369 27361 27380 52.4 55 3869 27463 27445 50.8 42.1 1.6 103 71.7 44.7 34 50.5 350 1370 27361 27380 52.4 55 3870 27464 27446 51.7 47.4 0.7 104 71.9 45.2 34 51 351 1371 25348 25365 50.4 50 3871 25645 25626 50.8 45 0.4 298 74.6 41.3 34 52.4 352 1372 9922 9941 51.3 50 3872 10449 10431 50.9 47.4 0.3 528 75.4 40.9 34 53.2 353 1373 13039 13057 51.1 52.6 3873 13323 13304 51.1 45 0 285 75.8 44.6 34 53.3 354 1374 12235 12253 50.1 52.6 3874 12412 12392 50 42.9 0.1 178 73.2 41.6 34 51.3 355 1375 3016 3036 50.2 42.9 3875 3185 3164 51 45.5 0.7 170 74.5 45.3 34 52.3 356 1376 13039 13057 51.1 52.6 3876 13326 13306 50.7 42.9 0.4 288 75.8 44.4 34 53.4 357 1377 7869 7889 52.5 47.6 3877 8050 8032 52 52.6 0.5 182 73.8 42.9 34 52.3 358 1378 26421 26441 51.5 42.9 3878 26655 26634 50.6 40.9 0.9 235 74.1 41.7 34 52.2 359 1379 26421 26441 51.5 42.9 3879 26657 26639 50.8 47.4 0.7 237 74.2 41.8 34 52.3 360 1380 26040 26061 56.4 54.5 3880 26183 26159 54.9 40 1.5 144 72 41 34 52 361 1381 26040 26061 56.4 54.5 3881 26183 26160 54.5 41.7 2 144 72 41 34 51.9 362 1382 26040 26061 56.4 54.5 3882 26184 26161 55.1 41.7 1.3 145 71.9 40 34 52 363 1383 12373 12391 50.8 47.4 3883 12724 12705 52.4 55 1.6 352 75.6 42.9 34 53.2 364 1384 26040 26061 56.4 54.5 3884 26589 26569 54.7 47.6 1.7 550 75.1 40 34 54.1 365 1385 26039 26058 54 55 3885 26183 26159 54.9 40 0.9 145 71.9 40.7 34 51.7 366 1386 26039 26058 54 55 3886 26183 26160 54.5 41.7 0.4 145 71.9 40.7 34 51.7 367 1387 26039 26058 54 55 3887 26183 26161 54 43.5 0 145 71.9 40.7 34 51.7 368 1388 26039 26058 54 55 3888 26184 26163 53 40.9 1 146 71.8 40.4 34 51.3 369 1389 26039 26057 52.6 52.6 3889 26174 26153 51 40.9 1.6 136 71.8 41.2 34 50.7 370 1390 10246 10266 50.4 47.6 3890 10605 10588 51.1 50 0.6 360 74.5 40.3 34 52.4 371 1391 3234 3254 51.1 47.6 3891 3497 3478 51.3 50 0.2 264 74.3 41.3 34 52.4 372 1392 26039 26057 52.6 52.6 3892 26183 26162 52.81 45.5 0.2 145 71.9 40.7 34 51.2 373 1393 11540 11557 50.4 50 3893 12253 12235 50.1 52.6 0.3 714 76.2 42.2 34 53.5 374 1394 3234 3254 51.1 47.6 3894 3500 3481 51.2 50 0.1 267 74.3 41.2 34 52.4

375 1395 3794 3812 52.9 52.6 3895 4445 4424 51.3 40.9 1.6 652 75.5 40.5 34 53.3 376 1396 3794 3812 52.9 52.6 3896 4446 4425 51.8 45.5 1.1 653 75.5 40.6 34 53.5 377 1397 3234 3254 51.1 47.6 3897 3646 3625 52 40.9 1 413 75.1 41.2 34 53 378 1398 3234 3254 51.1 47.6 3898 3647 3628 50.6 45 0.5 414 75.2 41.3 34 52.9 379 1399 3226 3245 51.7 55 3899 3497 3478 51.3 50 0.4 272 74.6 41.9 34 52.7 380 1400 3797 3815 50.9 47.4 3900 4444 4424 50.6 42.9 0.4 648 75.4 40.4 34 53.1 381 1401 3226 3245 51.7 55 3901 3500 3481 51.2 50 0.5 275 74.6 41.8 34 52.7 382 1402 16366 16384 50.3 52.6 3902 16780 16760 51.4 42.9 1.1 415 75.1 41 34 52.7 383 1403 25782 25806 53.5 40 3903 26183 26161 54 43.5 0.5 402 74.7 40.3 34 53.5 384 1404 16366 16385 52.9 55 3904 16780 16760 51.4 42.9 1.4 415 75.1 41 34 53.1 385 1405 16367 16386 51.4 50 3905 16781 16761 51.3 47.6 0.1 415 75.1 41 34 53 386 1406 12236 12256 51.2 42.9 3906 12992 12974 51.2 52.6 0 757 76.5 42.5 34 54 387 1407 16367 16386 51.4 50 3907 16777 16758 51.5 50 0.1 411 75 40.9 34 53 388 1408 16367 16386 51.4 50 3908 16711 16691 51 42.9 0.3 345 75.2 42 34 53 389 1409 3226 3245 51.7 55 3909 3503 3484 51.5 50 0.3 278 74.7 41.2 34 52.9 390 1410 16548 16566 54.9 52.6 3910 16782 16760 54.3 43.5 0.6 235 74 41.3 34 53.2 391 1411 16549 16567 54.9 52.6 3911 16782 16760 54.3 43.5 0.6 234 74 41.5 34 53.2 392 1412 25354 25372 50.9 52.6 3912 25645 25626 50.8 45 0.2 292 74.4 41.1 34 52.4 393 1413 16551 16568 51.1 50 3913 17038 17021 50.7 50 0.4 488 75.8 42.2 34 53.4 394 1414 25348 25366 51.2 47.4 3914 25645 25626 50.8 45 0.4 298 74.6 41.3 34 52.5 395 1415 16551 16568 51.1 50 3915 16780 16760 51.4 42.9 0.3 230 73.9 41.3 34 52.2 396 1416 7725 7743 50.8 47.4 3916 8049 8032 50.4 50 50 325 74.9 41.5 34 52.6 397 1417 29200 29224 54.2 40 3917 29299 29280 53.9 55 0.3 100 72.8 48 34 52.2 400 1420 29200 54.2 40 3918 29301 29282 55.3 55 1.1 102 73 48 34 52.4 399 1419 29200 29223 53.7 41.7 3919 29299 29280 53.9 55 0.2 100 72.8 48 34 52.2 400 1420 29200 29223 53.7 41.7 3920 29301 29282 55.3 55 1.6 102 73 48 34 52.3 401 1421 29199 29222 54.6 41.7 3921 29301 29282 55.3 55 0.7 103 72.9 47.6 34 52.5 402 1422 29200 29222 53.2 43.5 3922 29299 29280 53.9 55 0.7 100 72.8 48 34 52 403 1423 29199 29221 54.1 43.5 3923 29301 29282 55.3 55 1.2 103 72.9 47.6 34 52.3 404 1424 29200 29221 52.6 45.5 3924 29299 29280 53.9 55 1.3 100 72.8 48 34 51.9 405 1425 18074 18093 50.3 45 3925 18239 18220 50 45 0.3 166 73.9 44 34 51.8 406 1426 18074 18093 50.3 45 3926 18238 18219 50.3 45 0 165 74 44.2 34 51.9 407 1427 1402 1426 54.1 40 3927 1774 1755 53.1 50 1 373 75.8 43.2 34 54.1 408 1428 18074 18094 51.1 42.9 3928 18697 18679 51.9 52.6 0.8 624 76.2 42.5 34 53.8 409 1429 18074 18094 51.1 42.9 3929 18239 18220 50 45 1 166 73.9 44 34 51.8 410 1430 18074 18094 51.1 42.9 3930 18238 18219 50.3 45 0.8 165 74 44.2 34 51.9 411 1431 3226 3245 51.7 55 3931 3504 3485 50.4 45 1.3 279 74.7 41.9 34 52.5 412 1432 18081 18099 51.2 52.6 3932 18662 18641 50.4 40.9 0.7 582 76 34 53.6 413 1433 7725 7742 50 50 3933 8049 8032 50.4 50 0.3 325 74.9 41.5 34 52.5 414 1434 29182 29205 54.6 41.7 3934 29301 29282 55.3 55 0.7 120 73.4 46.7 34 52.9 415 1435 4255 4276 51.7 45.5 3935 4711 4692 51.2 45 0.5 457 75.1 40.7 34 53 416 1436 29183 29204 50.4 40.9 3936 29298 29280 51.4 52.6 1.1 116 72.8 45.7 34 51.2 417 1437 3225 3243 50.9 52.6 3937 3497 3478 51.3 50 0.4 273 74.7 42.1 34 52.7 418 1438 29181 29202 53.9 45.5 3938 29301 29282 55.3 55 1.4 121 73.6 47.1 34 52.8 419 1439 29182 29202 51.2 42.9 3939 29298 29280 51.4 52.6 0.2 117 73.1 46.2 34 51.6 420 1440 29199 29199 50.1 40 3940 29298 29280 51.4 52.6 1.3 119 73.2 46.2 34 51.4 421 1441 28970 28993 53.3 41.7 3941 29301 29282 55.3 55 1.9 332 76.1 44.6 34 54.4 422 1442 28971 28993 51.9 43.5 3942 29298 29280 51.4 52.6 0.5 328 76.1 44.5 34 53.8 423 1443 4255 4276 51.7 45.5 3943 4711 4693 50.4 47.4 1.3 457 75.1 40.7 34 52.8 424 1444 12976 12996 51.8 42.9 3944 13545 13526 52.9 55 1.1 570 77.4 45.6 34 54.8 425 1445 28968 28989 51.5 45.5 3945 29306 29288 53.5 52.6 2 339 76.3 44.8 34 54 426 1446 3225 3243 50.9 52.6 3946 3500 3481 51.2 50 0.3 276 74.7 42 34 52.6 427 1447 3225 3243 50.9 52.6 3947 3503 3484 51.5 50 0.6 279 74.8 42.3 34 52.7 428 1448 3225 3243 50.9 52.6 3948 3504 3485 50.4 45 0.5 280 74.8 42.1 34 52.6 429 1449 28939 28961 55.2 47.8 3949 29301 29282 55.3 55 0.1 363 76.6 45.2 34 55.3 430 1450 28941 28961 51.6 42.9 3950 29306 29288 53.5 52.6 1.8 366 76.4 44.8 34 54.1 431 1451 8867 8886 50.7 50 3951 9252 9235 50.1 50 0.6 386 75.1 41.5 34 52.7 432 1452 28939 28960 54.7 50 3952 29301 29282 55.3 55 0.6 363 76.6 45.2 34 55.1 433 1453 28940 28960 52.4 47.6 3953 29306 29288 53.5 52.6 1 367 76.5 45 34 54.4 434 1454 28941 28960 50.9 45 3954 29298 29280 51.4 52.6 0.5 358 76.3 44.7 34 53.8 435 1455 3360 3380 51.4 42.9 3955 3494 3473 50.4 40.9 1 135 73.7 45.9 34 51.8 436 1456 19790 19730 51.3 40.9 3956 19916 19895 50.2 40.9 1 208 73.6 41.3 34 51.7 437 1457 12373 12391 50.8 47.4 3957 12994 12976 50.3 47.4 0.4 622 76.4 42.9 34 53.7 438 1458 19794 19813 50 50 3958 19921 19900 51.8 45.5 1.8 128 72.6 43.8 34 50.9 439 1459 3361 3381

12992 12974 51.2 52.6 0.6 759 76.5 42.6 34 53.8 441 1461 12234 12252 50.6 47.4 3961 12994 12976 50.3 47.4 0.2 761 76.4 42.4 34 53.7 442 1462 3034 3053 50.3 50 3962 3647 3628 50.6 45 0.3 614 76.4 42.8 34 53.6 443 1463 8867 8887 52.3 47.6 3963 9254 9236 50.6 47.4 1.7 388 75.1 41.2 34 52.8 444 1464 12726 12746 51.3 47.6 3964 12994 12976 50.3 47.4 1 269 75.1 43.1 34 52.8 445 1465 12234 12252 50.6 47.4 3965 12998 12979 50.1 45 0.5 765 76.4 42.5 34 53.6 446 1466 9926 9944 50.5 52.6 3966 10605 10588 51.1 50 0.6 680 75.8 41.2 34 53.3 447 1467 3034 3053 50.3 50 3967 3646 3625 52 40.9 1.7 613 76.3 42.7 34 53.6 448 1468 12977 12996 50.2 40 3968 13545 13527 50.3 52.6 0 569 77.4 45.5 34 54.3 449 1469 19799 19817 52.2 52.6 3969 19909 19885 52.5 40 0.3 111 71.6 43.2 34 50.8 450 1470 8867 8887 52.3 47.6 3970 9246 9226 50.5 42.9 1.8 380 75 41.1 34 52.7 451 1471 8867 8887 52.3 47.6 3971 9342 9323 52.1 50 0.3 476 75.7 42 35 53.7 452 1472 10141 10160 51 45 3972 10608 10589 51 50 0 468 74.9 40 35 52.8 453 1473 3192 3213 51.8 45.5 3973 3494 3473 50.4 40.9 1.4 303 74.9 41.9 35 52.6 454 1474 3360 3379 50.7 45 3974 3647 3628 50.6 45 0.1 288 75.5 43.3 53.1 455 1475 27367 27385 51.4 52.6 3975 27566 27546 50.7 47.6 0.7 200 74.8 44 20.5 35 52.7 456 1476 10250 10274 51.6 40 3976 10605 10588 51.1 50 0.5 356 74.6 40 35 52.6 457 1477 27367 27385 51.4 52.6 3977 27568 27548 50.2 42.9 1.2 402 74.6 44.1 35 52.4 458 1478 27367 27385 51.4 52.6 3978 27571 27551 51.4 42.9 0 205 74.6 43.9 35 52.7 459 1479 8867 8887 52.3 47.6 3979 9376 9355 51 40.9 1.3 510 75.7 41.8 35 53.4 460 1480 27367 27385 51.4 52.6 3980 27576 27555 51 40.9 0.4 210 74.8 44.3 35 52.8 461 1481 27367 27385 51.4 52.6 3981 27579 27558 51.1 40.9 0.3 213 75 35 52.9 462 1482 18704 18724 50.8 47.6 3982 19215 19194 50.2 40.9 0.5 512 75.5 41.2 35 53 463 1483 18704 18724 50.8 47.6 3983 19217 19196 50.2 40.9 0.5 514 75.5 41.2 35 53 464 1484 18696 18715 51.7 50 3984 19215 19194 50.2 40.9 1.5 520 75.6 41.3 35 53.1 465 1485 27365 27384 52.6 50 3985 27464 27443 54 45.5 1.4 100 70.8 43 35 50.4 466 1486 18696 18715 51.7 50 3986 19217 19196 50.2 40.9 1.5 522 75.6 41.4 35 53.1 467 1487 3361 3381 50.5 42.9 3987 3646 3625 52 40.9 1.5 286 75.5 43.7 35 53.1 468 1488 3361 3381 50.5 42.9 3988 3647 3628 50.6 45 0.1 287 75.6 43.9 35 53.1 469 1489 3782 3801 51.3 50 3989 4445 4425 50.6 42.9 0.7 664 75.5 40.5 35 53.1 470 1490 13039 13058 51.8 50 3990 13155 13137 52.1 52.6 0.3 117 73.4 47 35 52 471 1491 3782 3801 51.3 50 3991 4444 50.6 42.9 0.7 663 75.5 40.6 35 53.1 472 1492 13040 13059 50.9 50 3992 13747 13726 50.8 40.9 0.1 708 76.6 43.1 35 54 473 1493 2223 2243 50.2 42.9 3993 2747 2727 50 42.9 0.2 525 76.9 44.6 35 53.9 474 1494 9929 9946 50 50 3994 10449 10431 50.9 47.4 0.9 521 75.4 40.9 35 52.9 475 1495 18077 18097 51.5 47.6 3995 18702 18685 50.2 50 1.4 626 76.2 42.3 35 53.5 476 1496 3360 3379 50.7 45 3996 3646 3625 52 40.9 1.3 287 75.4 43.6 35 53.1 477 1497 26708 26731 54.2 41.7 3997 27463 27443 52.7 42.9 1.5 756 75.9 41.1 35 54 478 1498 26708 26731 54.2 41.7 3998 27464 27444 53 42.9 1.2 757 75.9 41.2 35 54 479 1499 26708 26731 54.2 41.7 3999 27464 27444 53 42.9 1.2 757 75.9 41.2 35 54 480 1500 4 22 52.3 52.6 4000 713 695 50.7 47.4 1.6 710 79 49 35 55.7 481 1501 26708 26727 50 45 4001 27462 27443 51.4 45 1.3 755 75.9 41.2 35 53.2 482 1502 3360 3380 51.4 42.9 4002 3646 3625 52 40.9 0.6 287 75.4 43.6 35 53.3 483 1503 26708 26727 50 45 4003 27463 27445 50.8 42.1 0.8 756 75.9 41.1 35 53.2 484 1504 988 1006 52.2 52.6 4004 1493 1474 50.8 45 1.5 506 76.5 43.7 35 53.9 485 1505 12352 12375 52.9 41.7 4005 12993 12975 51.4 47.4 1.5 642 76.5 43 35 54 486 1506 3360 3380 51.4 42.9 4006 3647 3628 50.6 45 0.8 288 75.5 43.8 35 53.1 487 1507 18074 18094 51.1 42.9 4007 18702 18685 50.2 50 0.9 629 76.2 42.3 35 53.5 488 1508 3360 3380 51.4 42.9 4008 3650 3631 51.3 50 1.7 291 75.6 44 35 53.5 489 1509 8374 8395 52.4 45.5 4009 8928 8911 51.9 50 0.6 555 75.1 40 35 53.2 490 1510 9929 9946 50 50 4010 10449 10428 51.9 40.9 1.9 521 75.4 40.9 35 52.9 491 1511 26421 26441 51.5 42.9 4011 27132 27111 50.3 40.9 1.2 712 77.1 44.2 35 54.2 492 1512 10250 10274 51.6 40 4012 10356 10336 52.4 47.6 0.8 107 70.8 42.1 35 50.2 493 1513 18074 18093 50.3 45 4013 18702 18685 50.2 50 0.2 629 76.2 42.3 35 53.5 494 1514 18017 18036 54.8 55 4014 18220 18202 54.8 52.6 0 204 74.3 43.1 35 53.5 495 1515 18017 18036 54.8 55 4015 18225 18206 53.7 50 1.1 209 74.3 43.1 35 53.2 496 1516 18017 18036 54.8 55 4016 18232 18210 54.4 47.8 0.4 216 74.6 43.5 35 53.6 497 1517 18017 18036 54.8 55 4017 18234 18214 53.4 47.6 1.4 218 74.7 43.6 35 53.4 498 1518 18017 18036 54.8 55 4018 18235 18215 54.2 52.4 0.6 219 74.8 43.8 35 53.7 499 1519 18017 18036 54.8 55 4019 18443 18424 55.9 55 1.1 427 76 43.1 35 54.7 500 1520 18012 18031 53.2 55 4020 18202 18202 54.8 52.6 1.7 209 74.5 43.5 35 53.2 501 1521 18013 18031 50.6 52.6 4021 18223 18206 51.8 50 1.1 211 74.4 43.1 35 52.4 502 1522 18013 18031 50.6 52.6 4022 18231 18210 52.2 45.5 1.6 219 74.6 43.4 35 52.5

503 1523 18013 18031 50.6 52.6 4023 18233 18214 52 50 1.4 221 74.8 43.9 35 52.7 504 1524 18013 18031 50.6 52.6 4024 18233 18215 51.3 52.6 0.7 221 74.8 43.9 35 52.7 505 1525 18013 18031 50.6 52.6 4025 18662 18641 50.4 40.9 0.2 650 76.3 42.6 35 53.7 506 1526 18009 18029 53.3 52.4 4026 18220 18202 54.8 52.6 1.6 212 74.5 43.4 35 53.2 507 1527 18011 18029 51.3 52.6 4027 18223 18206 51.8 50 0.5 213 74.4 43.2 35 52.6 508 1528 18011 18029 51.3 52.6 4028 18231 18210 52.2 45.5 0.9 221 74.7 43.4 35 52.8 509 1529 18011 18029 51.3 52.6 4029 18233 18214 52 50 0.7 223 74.9 43.9 35 52.9 510 1530 18011 18029 51.3 52.6 4030 18233 18215 51.3 52.6 0 223 74.9 43.9 35 52.9 511 1531 16374 16397 52.8 41.7 4031 16774 16751 53.6 41.7 0.8 401 75 40.9 35 53.4 512 1532 16378 16397 50.4 45 4032 16780 16760 51.4 42.9 1 403 75 40.9 35 52.7 513 1533 2223 2243 50.2 42.9 4033 2977 2976 51.4 40.9 1.2 775 76.7 43.1 35 53.9 514 1534 2428 2447 51.5 50 4034 3082 3058 52.3 40 0.8 655 76.3 42.6 35 54 515 1535 16548 16566 54.9 52.6 4035 16774 16751 53.6 41.7 1.3 227 73.9 41.4 35 52.9 516 1536 16367 16386 51.4 50 4036 16774 16752 52.2 43.5 0.8 408 75 40.9 35 53 517 1537 3230 3249 50.1 45 4037 3497 3478 51.3 50 1.2 268 74.4 41.4 35 52.2 518 1538 8221 8240 52.4 50 4038 8920 8901 53.4 50 1 700 75.3 40 35 53.6 519 1539 3232 3252 51.1 47.6 4039 3500 3481 51.2 50 0.1 269 74.5 41.6 35 52.5 520 1540 3232 3252 51.1 47.6 4040 3497 3478 51.3 50 0.2 266 74.5 41.7 35 52.6 521 1541 16367 16386 51.4 50 4041 17111 17090 51.1 40.9 0.3 745 76.3 42.1 35 53.8 522 1542 16366 16385 52.9 55 4042 16774 16751 53.6 41.7 0.8 409 75.1 41.1 35 53.5 523 1543 9930 9948 51.5 52.6 4043 10670 10649 51.3 40.9 0.2 721 75.8 40.9 35 53.5 524 1544 12370 12388 50.1 47.4 4044 12996 12977 50.2 40 0.2 627 76.4 42.7 35 53.6 525 1545 25354 25372 50.9 52.6 4045 25650 25631 51.3 45 0.4 297 74.5 41.1 35 52.5 526 1546 25354 25372 50.9 52.6 4046 25651 25634 50.4 50 0.5 298 74.6 41.3 35 52.4 527 1547 25354 25372 50.9 52.6 4047 25772 25753 51.9 50 1 419 74.8 40.3 35 52.8 528 1548 1402 1422 50.2 42.9 4048 1501 1482 50.5 45 0.3 100 72 46 35 50.6 529 1549 25354 25372 50.9 52.6 4049 25831 25809 51.4 43.5 0.5 478 75 40.2 35 52.8 530 1550 3797 3815 50.9 47.4 4050 4434 4416 51.5 52.6 0.5 638 75.4 40 35 53.1 531 1551 25354 25372 50.9 52.6 4051 25831 25810 50.7 45.5 0.2 478 75 40.2 35 52.8 532 1552 3797 3815 50.9 47.4 4052 4435 4417 50.5 52.6 0.5 639 75.4 40.4 35 53 533 1553 24481 24500 50.1 45 4053 24938 24921 50.4 50 0.3 458 75.6 41.9 35 53.1 534 1554 25348 25366 51.2 47.4 4054 25831 25809 51.4 43.5 0.2 484 75 40.3 35 53 535 1555 25348 25366 51.2 47.4 4055 25831 25810 50.7 45 0.4 484 75 40.3 35 52.8 536 1556 24419 24440 53.2 45 0.5 4056 25080 25062 53.5 52.6 1.2 662 75.7 41.1 35 53.8 537 1557 24420 24440 50.8 42.9 4057 24527 24508 50.5 45 0.3 108 70.7 41.7 35 49.8 538 1558 25348 25365 50.4 50 4058 25650 25631 51.3 45 0.9 303 74.6 41.3 35 52.4 539 1559 25348 25365 50.4 50 4059 25651 25634 50.4 50 0.1 304 74.7 41.4 35 52.5 540 1560 25348 25365 50.4 50 4060 25831 25809 51.4 43.5 1 484 75 40.3 35 52.7 541 1561 25348 25365 50.4 50 4061 25831 25810 50.7 45 0.3 484 75 40.3 35 52.7 542 1562 28618 28636 52.5 52.6 4062 29298 29280 51.4 52.6 1.1 681 78.3 47.3 35 55.3 543 1563 8867 8887 52.3 47.6 4063 9317 9297 50.5 42.9 1.8 451 75.5 41.7 35 53.1 544 1564 28820 28838 53.7 52.6 4064 29301 29282 55.3 55 1.6 482 77.1 45.4 35 55.2 545 1565 27365 27385 53.2 47.6 4065 27464 27443 54 45 0.8 100 70.8 43 35 50.6 546 1566 28820 28839 54.3 50 4066 29306 29288 53.5 52.6 0.8 487 77.1 45.4 35 55.1 547 1567 28820 28839 54.3 50 4067 29301 29282 55.3 55 1 482 77.1 45.4 35 55.4 548 1568 28821 28840 51.8 45 4068 29306 29288 53.5 52.6 1.7 486 77.1 45.3 35 54.6 549 1569 27370 27389 50.1 45 4069 27675 27656 50 40 0.1 306 74.2 40.2 35 52 550 1570 28820 28840 54.8 47.6 4070 29301 29282 55.3 55 0.4 482 77.1 45.4 35 55.5 551 1571 27370 27389 50.1 45 4071 27674 27654 51.9 42.9 1.8 305 74.2 40.3 35 52.1 552 1572 2429 2447 50.2 47.4 4072 3188 3167 50.2 40.9 0 760 76.6 42.9 35 53.8 553 1573 27375 27392 50 50 4073 27675 27656 50 0 301 74.1 40.2 35 52 554 1574 27375 27392 50 50 4074 27674 27654 51.9 42.9 1.9 300 74.2 40.3 35 52 555 1575 19795 19814 50.4 45 4075 19916 19895 50.2 40.9 0.2 122 71.8 42.6 35 50.5 556 1576 3168 3189 51 45.5 4076 3646 3625 52 40.9 1.1 479 75.7 42 35 53.4 557 1577 3168 3189 51 45.5 4077 3647 3628 50.6 45 0.4 480 75.8 42.1 35 53.3 558 1578 18011 18029 51.3 52.6 4078 18662 18641 50.4 40.9 0.9 652 76.3 42.6 35 53.7 559 1579 985 1004 51.1 50 4079 1493 1474 50.8 45 0.3 509 76.5 43.6 35 53.9 560 1580 12965 12985 51.2 42.9 4080 13547 13528 50.2 45 0.9 583 77.3 45.3 35 54.3 561 1581 2427 2445 52.1 52.6 4081 3188 3167 50.2 40.9 1.9 762 76.7 43 35 53.8 562 1582 3360 3381 52.1 40.9 4082 3650 3631 53.1 50 1 291 75.6 44 35 53.7 563 1583 12726 12746 51.3 47.6 4083 12911 12892 50.5 50 0.8 186 73.5 41.9 35 51.7 564 1584 19800 19817 50.4 50 4084 19917 19896 50.9 45 0.5 118 71.9 43.2 35 50.6 565 1585 1402 1426 54.1 40 4085 1501 1478 50.6 41.7 0.5 100 72 46 35 51.8 566 1586 2427 2445 52.1 52.6 4086 3082 3058 52.4 40 0.2 656 76.4 42.7 35 54.2 567 1587 8867 8887 52.3 47.6 4087 9257 9238 50.5 45 1.8 391 75.1 41.2 35 52.8 568 1588 8867 8887 52.3 47.6 4088 9249 9231 50.8 47.4 1.5 383 75.2 41.5 35 53 569 1589 8374 8394 51 42.9 4089 8928 8911 51.9 50 0.8 555 75.1 40 35 53 570 1590 8867 8887 52.3 47.6 4090 9249 9230 51.5 45 0.8 383 75.2 41.5 35 53.2 571 1591 28964 28984 54.3 52.4 4091 29301 29282 55.3 55 1 338 76.5 45.3 35 54.9 572 1592 8867 8887 52.3 47.6 4092 9249 9229 53 47.6 0.6 383 75.2 41.5 35 53.4 573 1593 12962 12980 50.7 47.4 4093 13547 13528 50.2 45 0.5 586 77.4 45.4 35 54.3 574 1594 9931 9950 50.2 45 4094 10605 10588 51.1 50 0.9 675 75.8 41.2 35 53.2 575 1595 19801 19819 53.2 52.6 4095 19918 19896 52.2 43.5 1 118 71.9 43.2 35 51.1 576 1596 9055 9079 52.8 40 4096 9376 9355 51 40.9 1.8 322 75.1 42.2 35 53 577 1597 19878 19899 50.5 40.9 4097 20033 20016 50.4 50 0.1 156 73.4 43.6 35 51.6 578 1598 17608 17628 50.9 42.9 4098 18233 18214 52 50 1.1 626 75.3 40.3 35 53.1 579 1599 17608 17627 50.2 45 4099 18233 18214 52 50 1.8 626 75.3 40.3 35 52.9 580 1600 29179 29199 51.4 42.9 4100 29358 29339 52.8 50 1.4 180 74.8 45.6 35 52.9 581 1601 29182 29202 51.2 42.9 4101 29358 29339 52.8 50 1.6 177 74.6 45.2 35 52.7 582 1602 4 22 52.3 52.6 4102 253 233 51.8 47.6 0.5 250 76.2 46.4 35 54 583 1603 8221 8240 52.4 50 4103 8920 8902 52.8 52.6 0.3 700 75.3 40 35 53.6 584 1604 16554 16572 53.7 52.6 4104 16774 16751 53.6 41.7 0.1 221 73.7 41.2 35 52.8 585 1605 16555 16572 50.3 50 4105 16711 16691 51 42.9 0.7 157 73.4 43.3 35 51.6 586 1606 29186 29205 50.1 40 4106 29412 29393 50.3 45 0.3 227 75.4 44.9 35 52.9 587 1607 2429 2447 50.2 47.4 4107 3052 3033 50.3 50 0.1 624 76.3 42.6 35 53.6 588 1608 29182 29205 54.6 41.7 4108 29358 29339 52.8 50 1.7 177 74.6 45.2 35 53.2 589 1609 4 22 52.3 52.6 4109 255 235 51.3 47.6 1 252 76.3 46.4 35 53.9 590 1610 3230 3249 50.1 45 4110 3500 3481 51.2 50 1.1 271 74.4 41.3 35 52.2 591 1611 13040 13059 50.9 50 4111 13177 13156 50.4 40.9 0.5 138 73.7 45.7 35 51.8 592 1612 16551 16568 51.1 50 4112 17039 17022 51.4 50 0.3 489 75.8 42.1 35 53.5 593 1613 19995 20012 50.4 50 4113 20615 20597 50.6 47.4 0.2 621 75.3 40.1 35 52.9 594 1614 19995 20013 51.8 52.6 4114 20615 20597 50.6 47.4 1.2 621 75.3 40.1 35 53 595 1615 12370 12388 50.1 47.4 4115 12993

24517 24494 53.2 41.7 0.6 101 71.1 43.6 35 50.6 606 1626 8375 8396 51.8 45.5 4126 8929 8911 53.4 52.6 1.6 555 75.1 40 35 53.2 607 1627 24418 24439 52.9
45.5 4127 25080 25062 53.5 52.6 0.6 663 75.8 41.2 35 54 608 1628 18074 18094 51.1 42.9 4128 18662 18641 50.4 40.9 0.6 589 76.2 42.6 36 53.6 609 1629 18074
18094 51.1 42.9 4129 18632 18611 50.2 40.9 0.9 559 76.2 42.8 36 53.5 610 1630 13231 13251 50.1 42.9 4130 13545 13527 50.3 52.6 0.2 315 77 47 36 54 611 1631
7400 7417 50.2 50 4131 8188 8169 50.5 45 0.3 789 76.4 42.2 36 53.6 612 1632 3792 3811 54 55 4132 4446 4424 52.4 43.5 1.6 655 75.5 40.6 36 53.7 613 1633
25782 25805 52.1 41.7 4133 26182 26161 51.2 40.9 0.9 401 74.7 40.1 36 52.7 614 1634 13230 13251 52.4 45.5 4134 13545 13526 52.9 55 0.5 316 77.1 47.2 36
54.8 615 1635 985 1004 51.1 50 4135 1480 1462 51.6 47.4 0.5 496 76.4 43.5 36 53.9 616 1636 7400 7417 50.2 50 4136 8049 8032 50.4 50 0.2 650 76.1 42.2 36
53.5 617 1637 13176 13197 52.7 45.5 4137 13545 13526 52.9 55 0.2 370 77 46.2 36 54.8 618 1638 25782 25806 53.5 40 4138 26183 26162 52.8 45.5 0.7 402 74.7
41.3 76 53.3 619 1639 13176 13196 51.4 47.6 4139 13547 13528 50.2 45 1.2 372 76.9 46 36 54.2 620 1640 12938 12956 50.1 47.4 4140 13155 13138 50.4 50 0.3
218 75 45.4 36 52.9 621 1641 18080 18099 53 50 4141 18712 18693 54.8 55 1.9 633 76.3 42 36 54.4 622 1642 9140 9159 50.1 45 4142 9317 9354 50.4 40.9
0.3 236 74.6 42.8 36 52.3 623 1643 7725 7742 50 50 4143 8054 8035 50.4 50 0.4 330 75 41.8 36 52.6 624 1644 9922 9941 51.3 50 4144 10455 10435 50.5 42.9 0.8
534 75.3 40.6 36 52.9 625 1645 12938 12957 50.9 45 4145 13155 13138 50.4 50 0.5 218 75.4 45.4 36 53 626 1646 12366 12384 51.7 52.6 4146 12996 12977 50.2
40 1.4 631 76.4 42.6 36 53.6 627 1647 7617 7636 50.9 50 4147 8049 8032 50.4 50 0.6 433 75.7 42.3 36 53.2 628 1648 2671 2692 52.1 40.9 4148 3188 3167 50.2
40.9 2 518 75.6 41.5 36 53.1 629 1649 26039 26057 52.6 52.6 4149 26183 26164 51 45 1.6 145 71.9 40.7 36 50.8 630 1650 11540 11557 50.4 50 4150 11727 11708
50.4 45 0.1 188 73.1 41 36 51.4 631 1651 12962 12980 50.7 47.4 4151 13545 13527 50.3 52.6 0.4 584 77.4 45.5 36 54.4 632 1652 12961 12980 53.2 50 4152
13545 13526 52.9 55 0.4 585 77.5 45.6 36 55.2 633 1653 9055 9079 52.8 40 4153 9369 9350 51.5 50 1.4 315 75.3 42.9 36 53.3 634 1654 12965 12985 51.2 42.9
4154 13545 13527 50.3 52.6 0.9 581 77.4 45.4 36 54.3 635 1655 26039 26058 54 55 4155 26693 26674 54.8 55 0.8 655 75.7 41.1 36

54.3 636 1656 26039 26058 54 55 4156 26692 26673 52.6 50 1.4 654 75.7 41 36 53.8 637 1657 26039 26058 54 55 4157 26688 26669 52.1 45 2 650 75.6 40.8 36
53.6 638 1658 26039 26058 54 55 4158 26684 26666 53.4 52.6 0.6 646 75.6 40.9 36 54.1 639 1659 26039 26058 54 55 4159 26683 26665 52.7 52.6 1.4 645 75.6
40.9 36 53.8 640 1660 12965 12985 51.2 42.9 4160 13545 13526 52.9 55 1.7 581 77.4 45.4 36 54.6 641 1661 26039 26058 54 55 4161 26183 26162 52.8 45.5 1.2
145 71.9 40.7 36 51.3 642 1662 9055 9079 52.8 40 4162 9365 9347 53 52.6 0.2 311 75.3 42.8 36 53.6 643 1663 17995 19814 50.4 45 4163 19922 19902 50 42.9
0.4 128 72.2 43 36 50.7 644 1664 12965 12988 54 41.7 4164 13545 13526 52.9 55 1.2 581 77.4 45.4 36 55.1 645 1665 26040 26061 56.4 54.5 4165 26693 26674
54.8 55 1.6 654 75.7 41.1 36 54.6 646 1666 26040 26061 56.4 54.5 4166 26693 26673 55.3 52.4 1.1 654 75.7 41.1 36 54.7 647 1667 26040 26061 56.4 54.5 4167
26690 26669 56.3 50 0.1 651 75.7 41 36 55 648 1668 26040 26061 56.4 54.5 4168 26685 26666 54.8 55 1.6 646 75.7 41 36 54.5 649 1669 26040 26061 56.4 54.5
4169 26685 26665 55.3 52.4 1.1 646 75.7 41 36 54.7 650 1670 18011 18031 54.5 41.7 18044 18424 55.9 55 1.4 433 76.1 43.2 36 54.7 651 1671 7876 7895
51.5 45 4171 8049 8032 50.4 50 1.2 174 73.2 42 36 51.5 652 1672 3230 3249 50.1 45 4172 3646 3625 52 40.9 1.9 417 75.2 41.2 36 52.8 653 1673 17975 19814
50.4 45 4173 19920 19899 50.2 40.9 0.3 126 72.1 42.9 36 50.6 654 1674 12366 12384 51.7 52.6 4174 12993 12975 51.4 47.4 0.3 628 76.5 43 36 54 655 1675
19793 19814 54 50 4175 20544 20524 53.3 47.6 1.7 752 75.4 40 36 53.6 656 1676 12366 12384 51.7 52.6 4176 12911 12892 50.5 50 1.2 546 76.1 42.5 36 53.5 657
1677 7728 7746 51.7 52.6 4177 8188 8168 50.4 42.9 1.3 461 75.6 41.9 36 53.1 658 1678 26421 26441 51.5 42.9 4178 27084 27063 51.6 40.9 0.2 664 77.3 45 36
54.7 659 1679 9929 9946 50 50 4179 10455 10434 51.1 40.9 1.1 527 75.3 40.6 36 52.8 660 1680 26421 26441 51.5 42.9 4180 27083 27062 50.7 40.9 0.8 663 77.4
45.1 36 54.5 661 1681 12236 12256 51.2 42.9 4181 12999 12980 50.6 40 0.6 764 76.4 42.4 36 53.8 662 1682 26421 26441 51.5 42.9 4182 26694 26677 51.4 50 0
274 74.9 42.7 36 53 663 1683 9929 9946 50 50 4183 10183 10166 50.9 50 0.8 255 75.3 43.9 36 52.8 664 1684 12234 12252 50.6 47.4 4184 13000 12981 51.1 45
0.5 767 76.4 42.5 36 53.8 665 1685 8868 8889 50.4 40.9 4185 9254 9236 50.6 47.5 0.2 387 75 41.1 36 52.7 666 1686 9130 9150 51.6 42.9 4186 9597 9577 50.3
42.9 1 468 75.4 41.2 36 52.9 667 1687 9935 9955 50.4 42.9 4187 10605 10588 51.1 50 0.7 671 75.8 41.1 36 53.2 668 1688 26421 26441 51.5 42.9 4188 26587
26569 52 47.4 0.5 167 72.3 40.1 36 51.2 669 1689 9130 9150 51.3 42.9 4189 9597 9576 51 40.9 0.3 468 75.4 41.2 36 53.2 670 1690 26708 26727 50 45 4190
27466 27449 51 50 0.9 759 76 41.4 36 53.3 671 1691 9130 9150 51.3 42.9 4191 9375 9354 50.4 40.9 0.9 246 74.7 42.7 36 52.5 672 1692 10246 10266 50.4 47.6
4192 10608 10589 51 50 0.5 363 74.5 40.2 36 52.4 673 1693 9924 9944 53.1 52.4 4193 10449 10425 54.6 40 1.5 526 75.4 40.9 36 53.8 674 1694 12366 12384 51.7
52.6 4194 12911 12891 51.2 47.6 0.5 546 76.1 42.5 36 53.7 675 1695 26708 26731 54.2 41.7 4195 27466 27448 52.3 52.6 1.9 759 76 41.4 36 54 676 1696 8867
8888 52.7 45.5 4196 9107 9086 51.6 45.5 1.1 241 74.1 41.5 36 52.5 677 1697 9131 9151 50.4 42.9 4197 9597 9577 50.3 42.9 0.1 467 75.4 41.3 36 53 678 1698
9131 9151 50.4 42.9 4198 9597 9576 51 40.9 0.6 467 75.4 41.3 36 53 679 1699 10242 10265 51.2 41.7 4199 10608 10589 51 50 0.3 367 74.5 40.1 36 52.5 680
1700 27361 27380 52.4 55 4200 27468 27451 51.1 50 1.3 108 72.3 45.4 36 51 681 1701 27361 27380 52.4 55 4201 27467 27450 52.1 50 0.3 107 72.4 45.8 36 51.4
682 1702 27361 27380 52.4 55 4202 27466 27449 51 50 1.4 106 72.5 46.2 36 51.1 683 1703 9926 9944 50.5 52.6 4203 10449 10428 51.9 40.9 1.4 524 75.4 40.8 36
53 684 1704 9926 9944 50.5 52.6 4204 10449 10431 50.9 47.4 0.5 524 75.4 40.8 36 53 685 1705 19802 19820 53 52.6 4205 19922 19901 51.5 45.5 1.4 121 72.3
43.8 36 51.2 686 1706 27361 27380 52.4 55 4206 27462 27443 51.4 45 1 102 71.8 45.1 36 50.8 687 1707 10140 10159 52.4 50 4207 10605 10588 51.1 50 1.3 466
75 40.3 36 52.9 688 1708 16366 16384 50.3 52.6 4208 16777 16758 51.5 50 1.2 412 75.1 41 36 52.8 689 1709 16366 16385 52.9 55 4209 16781 16761 51.3 47.6
1.6 416 75.1 41.1 36 53.1 690 1710 985 1008 56.1 50 4210 1484 1464 54.3 47.6 1.8 500 76.4 43.6 36 54.9 691 1711 16366 16385 52.9 55 4211 16777 16758 51.5
50 1.4 412 75.1 41 36 53.1 692 1712 27366 27384 52.2 52.6 4212 27466 27448 52.3 52.6 0.1 101 71.5 44.6 36 50.8 693 1713 985 1008 56.1 50 4213 1483 1462
54.3 45.5 1.8 499 76.4 43.5 36 54.8 694 1714 2823 2844 50.4 45.5 4214 3052 3033 50.3 50 0.2 230 74.1 41.7 36 52 695 1715 3224 3242 50.5 52.6 4215 3504 3485
50.4 45 0.1 281 74.7 42 36 52.5 696 1716 8867 8886 50.7 50 4216 9310 9291 51.2 45 0.5 444 75.4 41.4 36 53.1 697 1717 8867 8886 50.7 50 4217 9254 9236 50.6
47.4 0.1 388 75.1 41.2 36 52.8 698 1718 9349 9367 51.7 52.6 4218 9989 9968 51 40.9 0.7 641 75.4 40.4 36 53.2 699 1719 8867 8887 52.3 47.6 4219 9369 9350
51.5 50 0.8 503 75.8 42.1 36 53.6 700 1720 8867 8887 52.3 47.6 4220 9341 9322 51.1 50 1.2 475 75.7 41.9 36 53.4 701 1721 9926 9944 50.5 52.6 4221 10608
10589 51 50 0.5 683 75.8 41.1 36 53.3 702 1722 7725 7742 50 50 4222 8190 8172 50.3 47.4 0.3 466 75.6 41.8 36 53 703 1723 9131 9151 50.4 42.9 4223 9375
9354 50.4 40.9 0 245 74.7 42.9 36 52.5 704 1724 3055 3075 51.8 47.6 4224 3494 3473 50.4 40.9 1.4 440 76 43 36 53.4 705 1725 7725 7742 50 50 4225 8189 8170
50.6 50 0.6 465 75.6 41.9 36 53.1 706 1726 2823 2844 50.4 45.5 4226 3056 3038 50.8 52.6 0.3 234 74.2 41.9 36 52.2 707 1727 12370 12388 50.1 47.4 4227 13155
13138 50.4 50 0.3 786 76.8 43.4 36 53.9 708 1728 3055 3075 51.8 47.6 4228 3209 3189 50.5 47.6 1.3 155 74.1 45.2 36 52.1 709 1729 8867 8887 52.3 47.6 4229
9340 9319 50.8 45.5 1.6 474 75.6 41.8 36 53.3 710 1730 27367 27385 51.4 52.6 4230 27466 27448 52.3 52.6 0.9 100 71.6 45 36 50.6 711 1731 14951 14975 52.2
40 4231 15146 15129 50.3 50 1.9 196 73.2 40.8 36 51.4 712 1732 8867 8887 52.3 47.6 4232 9311 9292 50.7 50 1.6 445 75.4 41.6 36 53.1 713 1733 12234 12252
50.6 47.4 4233 12999 12980 50.6 40 0 766 76.4 42.4 36 53.8 714 1734 3055 3076 52.4 45.5 4234 3495 3473 51.8 43.5 0.6 441 76 43.1 36 53.9 715 1735 8867 8887
52.3 47.6 4235 9109 9087 50.5 43.5 1.8 243 74 41.2 36 52.1 716 1736 3055 3076 52.4 45.5 4236 3209 3189 50.5 47.6 2 155 74.1 45.2 36 52.1 717 1737 2671 2692
52.1 40.9 4237 3053 3034 50.3 50 1.8 383 74.7 40.5 36 52.5 718 1738 16981 17000 51.3 50 4238 17501 17481 51.2 42.9 0.1 521 75.9 42.2 36 53.6 719 1739 3796
3814 50.8 52.6 4239 4444 4424 50.6 42.9 0.2 649 75.5 40.5 36 53.1 720 1740 3796 3814 50.8 52.6 4240 4445 4425 50.6 42.9 0.2 650 75.5 40.5 36 53.1 721 1741
27382 27401 50.8 45 4241 27546 27527 51.3 50 0.6 165 73.7 43.6 36 51.9 722 1742 27382 27401 50.8 45 4242 27541 27522 50.1 45 0.6 160 73.4 43.1 36 51.5 723
1743 27383 27403 50.3 42.9 4243 27546 27527 51.3 50 1.1 164 73.5 43.3 36 51.7 724 1744 27383 27403 50.3 42.9 4244 27541 27522 50.1 45 0.1 159 73.2 42.8 36
51.4 725 1745 17789 17811 52.9 43.5 4245 18220 18202 54.8 52.6 1.9 432 74.9 40.5 36 53.4 726 1746 17791 17813 52.9 43.5 4246 18220 18202 54.8 52.6 1.9 430
74.9 40.5 36 53.4 727 1747 18004 18023 51.1 50 4247 18233 18215 51.3 52.6 0.2 230 75 43.9 36 52.9 728 1748 18004 18023 51.1 50 4248 18231 18210 52.2 45.5
1.1 228 74.7 43.4 36 52.8 729 1749 27437 27456 50.2 40 4249 27546 27527 51.3 50 1.1 110 72.4 45.5 36 50.8 730 1750 27437 27456 50.2 40 4250 27541 27522
50.1 45 0.1 105 71.8 44.8 36 50.4 731 1751 18004 18023 51.1 50 4251 18223 18206 51.8 50 0.6 220 74.5 43.2 36 52.6 732 1752 12233 12251 51.1 52.6 4252
12994 12976 50.3 47.4 0.8 762 76.4 42.5 36 53.7 733 1753 7869 7889 52.5 47.6 4253 8192 8172 50.9 42.9 1.6 324 75.2 42.3 36 53 734 1754 3224 3242 50.5 52.6
4254 3503 3484 51.5 50 0.9 280 74.8 42.1 36 52.6 735 1755 3224 3242 50.5 52.6 4255 3500 3481 51.2 50 0.6 277 74.6 41.9 36 52.5 736 1756 3224 3242 50.5 52.6
4256 3497 3478 51.3 50 0.8 274 74.6 42 36 52.5 737 1757 1 22 54.8 50 4257 204 185 56.6 55 1.8 204 75.1 45.1 36 54.1 738 1758 9140 9159 50.1 45 4258 9597
9576 51 40.9 0.9 458 75.3 41.3 36 52.9 739 1759 28179 28200 50.8 40.9 4259 28671 28653 50.2 52.6 0.6 493 79.7 51.7 36 56 740 1760 9140 9159 50.1 45 4260
9560 9540 51.6 42.9 1.5 421 75.2 41.3 36 52.8 741 1761 7728 7746 51.7 52.6 4261 8189 8170 50.6 50 1.1 462 75.7 42 36 53.3 742 1762 9140 9159 50.1 45 4262
9559 9539 50.6 42.9 0.5 420 75.3 41.4 36 52.8 743 1763 12235 12253 50.1 52.6 4262 12998 12979 50.1 45 0 764 76.5 42.5 36 53.7 744 1764 3225 3244 52.4 55
4264 3503 3484 51.5 50 1 279 74.8 42.3 36 52.9 745 1765 14951 14975 52.2 40 4265 15595 15576 50.8 45 1.3 645 75.5 40.6 36 53.2 746 1766 3225 3244 52.4 55
4266 3500 3481 51.2 50 1.3 276 74.7 42 36 52.7 747 1767 12233 12251 51.1 52.6 4267 12999 12980 50.6 40 0.6 767 76.4 42.5 36 53.8 748 1768 3225 3244 52.4
55 4268 3497 3478 51.3 50 1.1 273 74.7 42.1 36 52.8 749 1769 12233 12251 51.1 52.6 4268 13000 12981 51.1 45 0.1 768 76.5 42.6 36 54 750 1770 28395 28414
51.5 45 4270 28671 28653 50.2 52.6 1.3 277 78.5 51.3 36 55.1 751 1771 28395 28414 51.5 45 4271 28671 28652 52.8 55 1.3 277 78.5 51.3 36 55.5 752 1772 9931
9950 50.2 45 4272 10449 10431 50.9 47.4 0.8 519 75.3 40.8 36 52.9 753 1773 12235 12253 50.1 52.6 4273 12994 12976 50.3 47.4 0.2 760 76.4 42.5 36 53.6 754
1774 3359 3379 51.2 42.9 4274 3650 3631 53.1 50 1.9 292 75.6 43.8 36 53.4 755 1775 11543 11562 50.4 40 4275 12258 12238 50.3 42.9 0.2 716 76.1 41.9 36 53.5
756 1776 28396 28416 52.4 47.6 4276 28672 28653 51.8 55 0.5 277 78.6 51.6 36 55.7 757 1777 28396 28416 52.4 47.6 4277 28671 28652 52.8 55 0.4 276 78.6
51.4 36 55.8 758 1778 3229 3248 50.6 50 4278 3647 3628 50.6 45 0 419 75.3 41.5 36 53 759 1779 12235 12253 50.1 52.6 4279 12992 12974 51.2 52.6 1.1 758
76.5 42.6 36 53

53.8 768 1788 18008 18029 54.5 50 4288 18443 18424 55.9 55 1.4 436 76 43.1 36 54.7 769 1789 13039 13058 51.8 50 4289 13179 13158 50.4 40.9 1.5 141 74
46.1 36 52 770 1790 942 961 52.8 50 4290 1484 1466 53.1 52.6 0.4 543 76.9 44.4 36 54.7 771 1791 943 961 50.3 47.4 4291 1483 1464 51.3 45 1 541 76.8 44.2 36
53.9 772 1792 28867 28886 53.2 50 4292 29358 29339 52.8 50 0.3 492 76.9 44.9 36 54.8 773 1793 943 961 50.3 47.4 4293 1483 1465 50.5 47.4 0.3 541 76.8 44.2
36 53.9 774 1794 28866 28886 55.4 52.4 4294 29301 29282 55.3 55 0.2 436 77 45.4 36 55.6 775 1795 12352 12375 52.9 41.7 4295 12997 51.8 42.9 1.1 646
76.4 42.9 36 54.1 776 1796 28867 28887 53.7 47.6 4296 29358 29339 52.8 50 0.9 492 76.9 44.9 36 54.8 777 1797 3896 3917 50.7 40.9 4297 4608 4590 51.5 52.6
0.9 713 75.5 40.4 36 53.2 778 1798 6098 6118 50.3 42.9 4298 6486 6467 50.8 45 0.5 389 74.6 40.1 36 52.4 779 1799 28868 28888 51.4 42.9 4299 29358 29339
52.8 50 1.4 491 76.9 44.8 36 54.3 780 1800 8220 8240 54 47.6 4300 8931 8913 55.5 52.6 1.4 712 75.4 40 36 54.1 781 1801 2220 2239 51.3 45 4301 2672 2653
51.6 50 0.4 453 77 45.3 36 54.4 782 1802 12040 12057 50.6 50 4302 12493 12476 50.7 50 0.1 454 76.3 43.6 36 53.7 783 1803 942 960 52.1 52.6 4303 1483 1464
51.3 45 0.8 542 76.8 44.3 36 54.3 784 1804 28868 28889 52 40.9 4304 29358 29339 52.8 50 0.8 491 76.9 44.8 36 54.5 785 1805 942 960 52.1 52.6 4305 1483 1465
50.5 47.4 1.6 542 76.8 44.3 36 54 786 1806 12040 12057 50.6 50 4306 12724 12705 52.4 55 1.8 685 76.6 43.1 36 53.9 787 1807 942 960 52.1 52.6 4307 1484 1466
53.1 52.6 1 543 76.9 44.4 36 54.5 788 1808 11545 11563 50.8 47.4 4308 12253 12235 50.1 52.6 0.7 709 76.2 42.2 36 53.5 789 1809 98 118 50.6 42.9 4309 269 251
51.1 52.6 0.5 172 75 46.5 36 52.8 790 1810 12373 12391 50.8 47.4 4310 12911 12892 50.5 0 0.3 539 76.1 42.5 36 53.5 791 1811 16366 16384 50.3 52.6 4311
16781 16761 51.3 47.6 0.9 416 75 1.1 36 52.8 792 1812 9929 9946 50 50 4312 10183 10165 51.7 47.4 1.6 255 75.3 43.9 36 52.7 793 1813 12236 12256 51.2
42.9 4313 13000 12981 51.1 45 0.1 765 76.4 42.5 36 53.9 794 1814 3231 3252 52.7 45.5 4314 3650 3631 53.1 50 0.4 420 75.4 41.7 36 53.7 795 1815 11541 11560
50.1 45 4315 11727 11708 50.4 45 0.3 187 73 40.6 36 51.2 796 1816 3232 3252 51.1 47.6 4316 3494 3473 50.4 40.9 0.7 263 74.3 41.4 36 52.3 797 1817 7725 7743
50.8 47.4 4317 8054 8035 50.4 50 4 0.3 330 75 41.8 36 52.7 798 1818 28968 28988 50.9 47.6 4318 29358 29339 52.8 50 2 391 76.4 44.5 36 53.9 799 1819 11545
11563 50.8 47.4 4319 12257 12237 51.3 47.6 0.5 713 76.2 42.1 36 53.7 800 1820 24417 24436 52.6 50 4320 25080 25062 53.5 52.6 0.9 664 75.8 41.3 36 53.9 801
1821 28968 28989 51.5 45.5 4321 29358 29339 52.8 50 1.3 391 76.4 44.5 36 54.1 802 1822 3789 3808 53.5 50 4322 4318 4294 54.4 40 0.9 530 75.5 41.1 36 54
803 1823 3232 3252 51.1 47.6 4323 3646 3625 52 40.9 0.9 415 75.3 41.4 36 53.1 804 1824 3232 3252 51.1 47.6 4324 3647 3628 50.6 45 0.5 416 75.3 41.6 36 53
805 1825 28971 28993 51.9 43.5 4325 29306 29288 53.5 52.6 1.6 336 76.2 44.6 36 54 806 1826 24179 24200 53.3 40.9 4326 24818 24797 51.6 40.9 1.6 640 75.8
41.2 36 53.6 807 1827 3231 3251 52 47.6 4327 3650 3631 53.1 50 1.1 420 75.4 41.7 36 53.5 808 1828 9930 9950 52.6 47.6 4328 10449 10425 54.6 40 2 520 75.4
41 36 53.7 809 1829 8866 8885 51.1 45 4329 9254 9236 50.6 47.4 0.5 389 75 41.1 36 52.8 810 1830 2522 2541 51.4 45 4330 2672 2653 51.6 50 0.2 151 75.3 48.3
36 53.2 811 1831 11541 11561 50.9 42.9 4331 12258 12238 50.3 42.9 0.6 718 76.2 41.9 36 53.5 812 1832 3232 3251 50.3 50 4332 3646 3625 52 40.9 1.7 415 75.3
41.4 36 52.9 813 1833 3232 3251 50.3 50 4333 3647 3628 50.6 45 0.3 416 75.3 41.6 36 52.9 814 1834 23843 23863 50.3 42.9 4334 24527 24508 50.5 45 0.2 685
76 41.8 36 52.9 815 1835 21210 21228 53.2 52.6 4335 21317 21293 53.2 40 0 108 71.1 42.6 36 80.8 816 1836 3229 3249 51.4 47.6 4336 3650 3631 53.1 50 1.7
422 75.4 41.7 36 53.3 817 1837 3230 3249 50.1 45 4337 3494 3473 50.4 40.9 0.3 265 74.2 41.1 36 52.1 818 1838 2371 2389 50.3 47.4 4338 2997 2976 51.4 40.9
1.1 627 76.7 43.5 36 53.9 819 1839 29186 29206 51.3 42.9 4339 29298 29280 51.4 52.6 0.1 113 72.8 46 36 51.5 820 1840 9929 9946 50 50 4340 10455 10435 50.5
42.9 0.4 527 75.3 40.6 36 52.8 821 1841 9351 9370 51.2 50 4341 9989 9968 51 40.9 0.2 639 75 40.4 36 53.2 822 1842 25348 25365 50.4 50 4342 25772 25753
51.9 50 1.5 425 74.9 40.5 36 52.6 822 1843 1402 1422 50.2 42.9 4343 2103 2082 52 45.5 1.8 702 76.7 43.3 36 53.8 824 1844 9929 9946 50 50 4344 10608 10589
51 50 0.9 680 75.8 41.2 36 53.2 825 1845 9934 9953 50.7 50 4345 10608 10589 51 50 0.3 675 75.8 41.2 36 53.4 826 1846 13176 13196 51.4 47.6 4346 13544
13525 52.6 55 1.2 369 77.1 46.3 36 54.5 827 1847 7725 7743 50.8 47.4 4347 8189 8170 50.6 50 0.2 465 75.6 41.9 36 53.2 828 1848 7725 7743 50.8 47.4 4348
8190 8172 50.3 47.4 0.6 466 75.6 41.8 36 53.1 829 1849 18074 18093 50.3 45 4349 18662 18641 50.4 40.9 0.1 589 76.2 42.6 36 53.6 830 1850 18074 18093 50.3
45 4350 18632 18611 52.2 40.9 0.1 559 76.2 42.8 36 53.5 831 1851 29200 29222 53.2 43.5 4351 29306 29288 53.5 52.6 0.3 107 73.1 47.7 36 52.3 832 1852 25348
25366 51.2 47.4 4352 25545 25526 51.7 45 0.5 198 74.1 42.9 36 52.3 833 1853 25348 25366 51.2 47.4 4353 25545 25525 52.3 42.9 1.1 198 74.1 42.9 36 52.3 834
1854 29200 29223 53.7 41.7 4354 29306 29288 53.5 52.6 0.2 107 73.1 47.7 36 52.3 835 1855 25347 25366 52.7 50 4355 25545 25521 54.5 40 1.8 199 74.2 43.2 36
52.9 836 1856 3792 3811 54 55 4356 4447 4425 53 43.5 1 656 75 40.5 36 53.9 837 1857 29200 29224 54.2 40 4357 29306 29288 53.5 52.6 0.7 107 73.1 47.7 36
52.3 838 1858 985 1004 51.1 50 4358 1483 1465 50.5 47.4 0.6 499 76.4 43.5 36 53.7 839 1859 2427 2445 52.1 52.6 4359 3189 3168 51 45.5 1.1 763 76.7 43.1 36
54.1 840 1860 13701 13725 53.6 40 4360 14084 14060 53.6 40 0.1 384 74.6 40.1 36 53.4 841 1861 985 1004 51.1 50 4361 1483 1464 51.3 45 0.2 499 76.4 43.5 36
53.9 842 1862 8794 8813 51.6 45 4362 9559 9539 50.6 42.9 1 766 75.9 41.3 37 53.4 843 1863 3789 3806 50 50 4363 4435 4417 50.5 52.6 0.4 647 75.5 40.5 37
52.9 844 1864 13177 13197 50.3 42.9 4364 13314 13297 51 50 0.6 138 72.8 43.5 37 51.2 845 1865 3791 3808 50 50 4365 4435 4417 50.5 52.6 0.4 645 75.4 40.5
37 52.9 846 1866 9139 9159 52.5 47.6 4366 9364 9346 53.9 52.6 1.4 226 74.9 43.8 37 53.3 847 1867 3226 3245 51.7 55 4367 3494 3473 50.4 40.9 1.3 269 74.5
41.6 37 52.4 848 1868 13040 13059 50.9 50 4368 13314 13297 51 50 0.1 275 75.6 44.4 37 53.3 849 1869 2522 2541 51.4 45 4369 2891 2873 50.8 47.4 0.6 370 76
43.8 37 53.6 850 1870 8865 8884 50.4 45 4370 9245 9226 50 45 0.4 381 74.9 40.9 37 52.6 851 1871 3787 3804 50 50 4371 4434 4416 51.5 52.6 1.4 648 75.4 40.3
37 52.9 852 1872 3226 3245 51.7 55 4372 3646 3625 52 40.9 0.3 421 75.3 41.6 37 53.4 853 1873 3226 3245 51.7 55 4373 3647 3628 50.6 45 1.1 422 75.4 41.7 37
53.1 854 1874 3226 3245 51.7 55 4374 3650 3631 53.1 50 1.4 425 75.5 41.9 37 53.5 855 1875 2387 2405 51.6 52.6 4375 2747 2727 50 42.9 1.6 361 76.9 46 37
53.9 856 1876 18074 18093 50.3 45 4376 18229 18209 50.1 42.9 0.2 156 73.2 42.9 37 51.4 857 1877 13701 13725 53.6 40 4377 14059 14040 52.8 50 0.8 359 74.5
40.1 37 53.1 858 1878 3787 3804 50 50 4378 4435 4417 50.5 52.6 0.4 649 75.4 40.4 37 52.9 859 1879 13040 13059 50.9 50 4379 13323 13304 51.1 45 0.2 284
75.7 44.4 37 53.4 860 1880 3789 3806 50 50 4380 4434 4416 51.5 52.6 1.4 646 75.4 40.4 37 52.9 861 1881 15506 15527 50.8 40.9 4381 16214 16196 51.8 52.6 1
709 75.5 40.3 37 53.2 862 1882 12234 12252 50.6 47.4 4382 12412 12392 50 42.9 0.6 179 73.1 41.3 37 51.3 863 1883 12234 12252 50.6 47.4 4383 12739 12718
51 40.9 0.4 506 75.8 42.1 37 53.4 864 1884 18074 18094 51.1 42.9 4384 18229 18209 50.1 42.9 0.9 156 73.2 42.9 37 51.4 865 1885 18075 18095 50.6 47.6 4385
18223 18206 51.8 50 1.2 149 73.3 43.6 37 51.6 866 1886 13040 13059 50.9 50 4386 13326 13306 50.7 42.9 0.2 287 75.7 44.3 37 53.3 867 1887 18080 18098 51.2
52.6 4387 18233 18215 51.3 52.6 0.1 154 73.9 44.8 37 52.2 868 1888 18080 18098 51.2 52.6 4388 18233 18214 52 50 0.9 154 73.9 44.8 37 52.2 869 1889 18080
18098 51.2 52.6 4389 18231 18210 52.2 45.5 1 152 73.5 44.1 37 51.9 870 1890 18080 18098 51.2 52.6 4390 18223 18206 51.8 50 0.6 144 73.2 43.8 37 51.7 871
1891 18077 18098 52.9 50 4391 18220 18202 54.8 52.6 1.9 144 73.2 43.8 37 52.2 872 1892 18076 18098 54.4 47.8 4392 18443 18424 55.9 55 1.5 368 75.8 43.2 37
54.5 873 1893 3792 3810 52.9 52.6 4393 4436 4417 52.2 50 0.6 645 75.4 40.5 37 53.6 874 1894 3055 3074 51.1 50 4394 3647 3628 50.6 45 0.5 593 76.3 42.7 37
53.7 875 1895 3055 3074 51.1 50 4395 3646 3625 52 40.9 0.9 592 76.2 42.6 37 53.8 876 1896 15506 15527 50.8 40.9 4396 15645 15625 51.1 42.9 0.4 140 71.8
40.7 37 50.6 877 1897 18081 18099 51.2 52.6 4397 18229 18209 50.1 42.9 1.1 149 73.3 43.6 37 51.4 878 1898 13039 13058 51.8 50 4398 13155 13138 50.4 50 1.4
117 73.4 47 37 51.6 879 1899 3055 3075 51.8 47.6 4399 3650 3631 53.1 50 1.3 596 76.3 42.8 37 54.1 880 1900 18080 18099 53 50 4400 18223 18205 53.3 52.6
0.4 144 73.2 43.8 37 52.2 881 1901 27361 27380 52.4 55 4401 27579 27558 51.1 40.9 1.3 219 75.4 45.2 37 53.2 882 1902 3221 3239 51.5 52.6 4402 3503 3484
51.5 50 0 283 74.8 42 37 52.9 883 1903 3221 3239 51.5 52.6 4403 3504 3485 50.1 40.9 1.3 219 75.4 45.2 37 53.2 884 1904 18077 18099 54.4 47.8 4404 18220
18201 56.1 55 1.7 144 73.2 43.8 37 52.6 885 1905 3055 3075 51.8 47.6 4405 3647 3628 50.6 45 1.2 593 76.3 42.7 37 53.7 886 1906 18581 18599 51.4 47.4 4406
18697 18679 51.9 52.6 0.4 117 71 41 37 50.2 887 1907 18616 18636 51.4 47.6 4407 19216 19195 50.2 40.9 1.1 601 75.6 41.1 37 53.1 888 1908 3219 3238 50.7 50
4408 3503 3484 51.5 50 0.8 285 74.8 42.1 37 52.7 889 1909 18696 18715 51.7 50 4409 19216 19195 50.2 40.9 1.5 521 75.5 41.3 37 53 890 1910 3219 3238 50.7
50 4410 3504 3485 50.4 45 0.3 286 74.7 42 37 52.5 891 1911 27366 27384 52.2 52.6 4411 27573 27552 52.3 40.9 0.1 208 74.6 43.8 37 52.5 892 1912 27366 27384
52.2 52.6 4412 27567 27547 51.1 42.9 1 202 74.6 44.1 37 52.7 893 1913 3055 3075 51.8 47.6 4413 3646 3625 52 40.9 0.2 592 76.2 42.6 37 54 894 1914 18704
18724 50.8 47.6 4414 19216 19195 50.2 40.9 0.5 513 75.5 41.1 37 53 895 1915 16874 16893 52.1 50 4415 17056 17035 51.8 45.5 0.4 183 74.4 44.3

37 52.7 896 1916 12234 12252 50.6 47.4 4416 12739 12719 50.3 42.9 0.3 506 75.8 42.1 37 53.3 897 1917 7728 7746 51.7 52.6 4417 8054 8035 50.4 50 1.2 327 75
41.9 37 52.7 898 1918 15506 15527 50.8 40.9 4418 15647 15628 51 45 0.3 142 71.9 40.8 37 50.7 899 1919 985 1004 51.1 50 4419 1773 1755 51.7 52.6 0.6 789
76.7 43.1 37 54.1 900 1920 3217 3236 51.1 50 4420 3503 3484 51.5 50 0.4 287 74.8 42.2 37 52.8 901 1921 3791 3808 50 50 4421 4434 4416 51.5 52.6 1.4 644
75.4 40.4 37 52.9 902 1922 19794 19813 50 50 4422 19923 19904 50.1 50 0.1 130 72.7 43.8 37 51 903 1923 13039 13058 51.8 50 4423 13178 13157 50.4 40.9 1.5
140 73.8 45.7 37 51.9 904 1924 13033 13051 52.1 52.6 4424 13155 13138 50.4 50 1.7 123 73.7 47.2 37 51.8 905 1925 12233 12251 51.1 52.6 4425 12739 12719
50.3 42.9 0.9 507 75.9 42.2 37 53.3 906 1926 19795 19814 50.4 45 4426 19923 19903 50.9 47.6 0.4 129 72.5 43.4 37 51 907 1927 13177 13197 50.3 42.9 4427
13946 13929 51.5 50 1.2 770 75.9 41 37 53.3 908 1928 3799 3820 52.9 45.5 4428 4318 4294 54.4 40 1.5 520 75.4 41 37 53.7 909 1929 8867 8887 52.3 47.6 4429
9364 9346 53.9 52.6 1.6 498 75.8 42.7 37 53.9 910 1930 1472 1491 51.2 45 4430 2152 2133 50.7 45 0.5 681 76.5 42.9 37 53.8 911 1931 12233 12251 51.1 52.6
4431 12739 12718 51 40.9 0.2 507 75.9 42.2 37 53.5 912 1932 3055 3076 52.4 45.5 4432 3650 3631 53.1 50 0.7 596 76.3 42.8 37 54.2 913 1933 12726 12746 51.3
47.6 4433 13325 13305 50.5 47.6 0.7 600 76.7 43.7 37 53.9 914 1934 8867 8887 52.3 47.6 4434 9316 9296 50.8 42.9 1.5 450 75.4 41.6 37 53.1 915 1935 8867
8887 52.3 47.6 4435 9314 9295 51.1 50 1.2 448 75.5 41.7 37 53.3 916 1936 8867 8887 52.3 47.6 4436 9313 9294 50.4 50 1.9 447 75.5 41.6 37 53 917 1937 3055
3076 52.4 45.5 4437 3647 3628 50.6 45 1.8 593 76.3 42.7 37 53.7 918 1938 13176 13196 51.4 47.6 4438 13312 13294 51 52.6 0.4 137 72.9 43.8 37 51.5 919 1939
12726 12746 51.3 47.6 4439 13155 13138 50.4 50 0.9 430 76.4 44 37 53.7 920 1940 13071 13274 53.1 41.7 4440 14058 14040 51.4 52.6 1.7 358 74.5 40.2 37 52.7
921 1941 8372 8390 50.7 47.4 4441 9101 9081 50.5 47.6 0.2 730 75.5 40.3 37 53.1 922 1942 3055 3076 52.4 45.5 4442 3646 3625 52 40.9 0.

75.3 40.1 37 52.9 935 1955 19991 20009 52.8 52.6 4455 20616 20597 52.3 45 0.5 626 75.3 40.1 37 53.5 936 1956 16875 16895 51.6 47.6 4456 17060 17041 51.1 50 0.5 186 74.6 44.6 37 52.6 937 1957 16875 16895 51.6 47.6 4457 17059 17039 50.6 47.6 1 185 74.4 44.3 37 52.4 938 1958 16875 16895 51.6 47.6 4458 17056 17035 51.8 45.5 0.2 182 74.2 44 37 52.5 939 1959 27442 27461 51.5 40 4459 27541 27521 51.7 47.6 0.1 100 71.2 44 37 50.4 940 1960 16875 16895 52.2 45.5 4460 17060 17041 51.1 50 1.1 186 74.6 44.6 37 52.6 941 1961 23841 23859 50.5 52.6 4461 24527 24507 51 42.9 0.5 687 76.1 41.9 37 53.5 942 1962 23841 23859 50.5 52.6 4462 24093 24075 50.9 52.6 0.4 253 76 45.8 37 53.5 943 1963 16875 16895 52.2 45.5 4463 17059 17039 50.6 47.6 1.6 185 74.4 44.3 37 52.4 944 1964 16875 16895 52.2 45.5 4464 17056 17035 51.8 45.5 0.5 182 74.2 44 37 52.6 945 1965 23843 23863 50.3 42.9 4465 24093 24075 50.9 52.6 0.5 251 75.8 45.4 37 53.3 946 1966 16875 16895 52.2 45.5 4466 17041 17023 53.5 52.6 1.3 167 73.8 43.7 37 52.4 947 1967 28187 28205 53.1 52.6 4467 28673 28654 53.5 55 0.5 487 80 52.4 37 57 948 1968 28190 28208 51.7 52.6 4468 28672 28654 50.6 52.6 1.2 483 79.9 52.2 37 56.2 949 1969 24030 24047 50.7 50 4469 24527 24508 50.5 45 0.2 498 75.4 41.2 37 53 950 1970 24031 24050 56.5 55 4470 24816 24792 54.7 40 1.8 786 76.3 42 37 54.9 951 1971 7880 7900 50.3 42.9 4471 8049 8032 50.4 50 0 170 72.8 41.2 37 51.2 952 1972 24096 24119 54.4 41.7 4472 24815 24791 54.5 40 0.1 720 75.8 41 37 54.5 953 1973 17790 17811 51.6 40.9 4473 18233 18214 52 50 0.4 444 75.1 40.8 37 53.2 954 1974 24174 24194 50.9 42.9 4474 24938 24921 50.4 50 0.5 765 75.8 40.9 37 53.3 955 1975 16875 16895 52.2 45.5 4475 17039 17022 51.4 50 0.8 165 73.7 43.6 37 52.1 956 1976 24174 24195 52.5 40.9 4476 24936 24919 51.8 50 0.7 763 75.8 41 37 53.7 957 1977 24179 24198 51 45 4477 24938 24921 50.4 50 0.6 760 75.8 40.9 37 53.3 958 1978 16875 16895 52.2 45.5 4478 17038 17021 50.7 50 1.6 164 73.8 43.9 37 52 959 1979 24180 24199 50.3 40 4479 24936 24919 51.8 50 1.5 757 75.8 41 37 53.2 960 1980 2823 2844 50.4 45.5 4480 3186 3165 50.4 40.9 0 364 75.5 42.6 37 53.1 961 1981 10142 10163 51.3 40.9 4481 10608 10589 51 50 0.3 467 74.9 40 37 52.8 962 1982 1046 1063 50.3 50 4482 1483 1464 51.3 45 0.9 438 76.2 43.6 37 53.6 963 1983 17388 17408 50.7 42.9 4483 17501 17481 51.2 42.9 0.6 114 70.5 40.4 37 49.7 964 1984 24179 24200 53.3 40.9 4484 24740 24717 52.5 41.7 0.8 562 76 42.2 37 54 965 1985 24379 24398 55 55 4485 25088 25070 54.5 52.6 0.5 710 75.9 41.3 37 54.6 966 1986 24379 24398 55 55 4486 25087 25069 53.7 52.6 1.3 709 75.9 41.3 37 54.3 967 1987 16874 16893 52.1 50 4487 17059 17039 50.6 47.6 1.5 186 74.6 44.6 37 52.5 968 1988 24380 24399 55 55 4488 25088 25070 54.5 52.6 0.5 709 75.9 41.3 37 54.6 969 1989 28522 28542 50.2 42.9 4489 28671 28653 50.2 52.6 0 150 76.2 50.7 37 53.5 970 1990 16874 16893 52.1 50 4490 17060 17041 51.1 50 1 187 74.7 44.9 37 52.7 971 1991 24380 24399 55 55 4491 25087 25069 53.7 52.6 1.3 708 75.9 41.4 37 54.4 972 1992 17608 17627 50.2 45 4492 18239 18220 50 45 0.2 632 75.3 40.2 37 52.8 973 1993 17608 17627 50.2 45 4493 18238 18219 50.3 45 0.1 631 75.3 40.3 37 52.9 974 1994 1046 1063 50.3 50 4494 1483 1465 50.5 47.4 0.2 438 76.2 43.6 37 53.6 975 1995 17608 17628 50.9 42.9 4495 18239 18220 50 45 0.9 632 75.3 40.2 37 52.8 976 1996 17608 17628 50.9 42.9 4496 18238 18219 50.3 45 0.7 631 75.3 40.3 37 52.9 977 1997 8063 8084 51.4 45.5 4497 8188 8169 50.5 45 0.9 126 72.1 42.9 37 50.7 978 1998 12236 12256 51.2 42.9 4498 12739 12718 51 40.9 0.2 504 75.8 42.1 37 53.5 979 1999 13176 13196 51.4 47.6 4499 13325 13305 50 50 1.5 313 76.9 46.6 37 54.5 980 2000 2371 2389 50 37 47.4 4500 2749 2728 50.3 45.5 0 379 76.9 45.9 37 54.1 981 2001 9402 9420 51.3 47.4 4501 9989 9968 51 40.9 0.4 588 75.4 40.5 37 53.1 982 2002 9931 9950 50.2 45 4502 10183 10166 50.9 50 0.7 253 75.2 43.9 37 52.8 983 2003 2387 2405 51.6 52.6 4503 2997 2976 51.4 40.9 0.2 611 76.6 43.5 37 54.2 984 2004 3788 3805 50 50 4504 4435 4417 50.5 52.6 0.4 648 75.4 40.4 37 52.9 985 2005 26039 26057 52.6 52.6 4505 26650 26630 51.4 42.9 1 612 75.3 40.4 37 53.3 986 2006 2371 2389 50 37 47.4 4506 3053 3034 50.6 0 683 76.3 43.3 37 53.9 987 2007 3 21 53.4 52.6 4507 315 296 51.0 50 1.5 313 76.9 46.6 37 54.5 988 2008 2371 2389 50 37 47.4 4508 3056 3037 52.1 55 1.7 686 76.7 43.4 37 53.9 989 2009 13040 13059 50.9 50 4509 13155 13137 51.2 52.6 1.2 116 73.2 46.6 37 51.6 990 2010 9931 9950 50.2 45 4510 10183 10165 51.7 47.4 1.5 253 75.2 43.9 37 52.8 991 2011 3788 3805 50 50 4511 4434 4416 51.5 52.6 1.4 647 75.4 40.3 37 52.9 992 2012 13176 13196 51.4 47.6 4512 13946 13929 51.5 50 0.2 771 75.9 41.1 37 53.6 993 2013 3772 3792 51.2 42.9 4513 4444 4424 50.6 42.9 0.7 673 75.6 40.7 37 53.2 994 2014 13176 13196 51.4 47.6 4514 13320 13300 51.4 47.6 0 145 73.3 44.1 37 51.9 995 2015 8861 8880 50.2 45 4515 9245 9226 50 45 0.1 385 74.9 40.8 37 52.5 996 2016 8868 8889 50.4 40.9 4516 9310 9291 51.2 45 0.8 443 75.3 41.3 37 52.9 997 2017 16366 16384 50.3 52.6 4517 16774 16752 52.2 43.5 1.9 409 75.1 41.1 37 52.8 998 2018 9934 9953 50.7 50 4518 10183 10166 50.9 50 0.2 250 75.2 44 37 53 999 2019 9055 9079 52.8 40 4519 9342 9323 52.1 50 0.8 288 75.1 42.7 37 53.3 1000 2020 8868 8889 50.4 40.9 4520 9249 9231 50.8 47.4 0.4 382 75.1 41.4 37 52.8 1001 2021 16366 16385 52.9 55 4521 16774 16752 52.2 43.5 0.6 409 75.1 41.1 37 53.3 1002 2022 8868 8889 50.4 40.9 4522 9249 9230 51.5 45 1.1 382 75.1 41.4 37 52.8 1003 2023 9934 9953 50.7 50 4523 10183 10165 51.7 47.4 0.9 250 75.2 44 37 53 1004 2024 25772 25793 52.4 40.9 4524 26183 26163 51.7 42.9 0.7 412 74.8 40.3 37 53 1005 2025 13039 13057 51.1 52.6 4525 13155 13138 50.4 50 0.7 117 73.4 47 37 51.6 1006 2026 25771 25790 51.1 45 4526 26183 26164 51 45 0.1 413 74.8 40.4 37 52.8 1007 2027 25769 25786 50.3 50 4527 26183 26163 51.7 42.9 1.4 415 74.9 40.5 37 52.6 1008 2028 3794 3812 52.9 52.6 4528 4436 4417 52.2 50 0.6 643 75.4 40.4 37 53.6 1009 2029 887 905 50.1 47.4 4529 1480 1462 51.6 47.4 1.5 594 77.1 44.6 37 54.1 1010 2030 3794 3812 52.9 52.6 4530 4434 4416 51.5 52.6 1.4 641 75.4 40.4 37 53.3 1011 2031 1011 12370 12388 50 14.4 4531 12994 12976 50.3 47.4 0.3 625 76.4 42.4 37 53.6 1012 2032 3797 3815 50.9 47.4 4532 4186 4168 51.8 52.6 0.9 390 75.3 41.8 37 53.1 1013 2033 3795 3813 52.1 52.6 4533 4435 4417 50.5 52.6 1.6 641 75.5 40.6 37 53.1 1014 2034 3795 3813 52.1 52.6 4534 4434 4416 51.5 52.6 0.6 640 75.4 40.5 37 53.3 1015 2035 13177 13197 50.3 42.9 4535 13323 13304 51.1 45 0.8 147 73.2 43.5 37 51.4 1016 2036 1046 1064 51.2 47.4 4536 1401 1382 50.6 45 0.6 356 75.6 43 37 53.2 1017 2037 16549 16567 54.9 52.6 4537 17057 17035 53 43.5 1.9 509 75.9 42.2 37 54.1 1018 2038 1046 1064 51.2 47.4 4538 1483 1464 51.3 45 0.1 438 76.2 43.6 37 53.8 1019 2039 16551 16568 51.1 50 4539 17056 17035 51.8 45.5 0.7 406 75.9 42.3 37 53.6 1020 2040 1046 1064 51.2 47.4 4540 1483 1465 50.5 47.4 0.6 438 76.2 43.6 37 53.6 1021 2041 1046 1064 51.2 47.4 4541 1484 1466 53.1 52.6 2 439 76.3 43.7 37 53.9 1022 2042 1046 1064 51.2 47.4 4542 1697 1676 51.7 40.9 0.5 652 76.9 43.9 37 54.2 1023 2043 1046 1064 51.2 47.4 4543 1697 1677 51 42.9 0.2 652 76.9 43.9 37

54.2 1024 2044 16555 16572 50.3 50 4544 17111 17090 51.1 40.9 0.8 557 76.1 42.5 37 53.5 1025 2045 1046 1064 51.2 47.4 4545 1697 1678 50.3 45 0.9 652 76.9 43.9 37 54 1026 2046 1046 1063 50.3 50 4546 1401 1382 50.6 45 0.2 356 75.6 43 37 53.1 1027 2047 3796 3814 50.8 52.6 4547 4435 4417 50.5 52.6 0.3 640 75.4 40.5 37 53.1 1028 2048 12232 12250 51.9 52.6 4548 12993 12975 51.4 47.4 0.5 762 76.5 42.5 37 54 1029 2049 12236 12256 51.2 42.9 4549 12739 12719 50.3 42.9 0.9 504 75.8 42.1 37 53.2 1030 2050 28937 28956 52.4 50 4550 29306 29288 53.5 52.6 1.1 370 76.6 45.1 37 54.4 1031 2051 12232 12250 51.9 52.6 4551 12996 12977 50.2 40 1.7 765 76.4 42.4 37 53.6 1032 2052 3234 3254 51.1 47.6 4552 3504 3485 50 45 0.7 271 74.4 41.3 37 52.3 1033 2053 3234 3254 51.1 47.6 4553 3503 3484 51.5 50 0.4 270 74.4 41.5 37 52.5 1034 2054 9922 9941 51.3 50 4554 10670 10649 51.3 40.9 0.1 749 75.8 40.9 37 53.5 1035 2055 3792 3810 52.9 52.6 4555 4434 4416 51.5 52.6 1.4 643 75.4 40.4 37 53.3 1036 2056 3234 3254 51.1 47.6 4556 3494 3473 50.4 40.9 0.6 261 74.1 41 37 52.1 1037 2057 4255 4276 51.7 45.5 4557 4608 4590 51.5 52.6 0.2 354 74.7 40.7 37 52.8 1038 2058 24562 24580 50.1 52.6 4558 24936 24919 51.8 50 1.7 375 75.6 42.7 37 53 1039 2059 24562 24580 50.1 52.6 4559 24938 24921 50.4 50 0.3 377 75.5 42.4 37 53 1040 2060 24562 24580 50.1 52.6 4560 25182 25164 51.4 47.4 1.3 621 75.9 41.7 37 53.3 1041 2061 24559 24579 52 52.4 4561 24936 24919 51.8 50 0.2 378 75.7 42.9 37 53.6 1042 2062 24559 24579 52 52.4 4562 24938 24921 50.4 50 1.6 380 75.6 42.6 37 53.1 1043 2063 1046 1063 50.3 50 4563 1697 1676 51.7 40.9 1.3 652 76.9 43.9 37 54 1044 2064 24482 24503 51.6 40.9 4564 24815 24792 53.4 41.7 1.8 334 75.4 42.8 37 53.4 1045 2065 13177 13197 50.3 42.9 4565 13326 13306 50 47 42.9 0.4 150 73.2 43.3 37 51.4 1046 2066 24480 24502 54.2 47.8 4566 24815 24791 54.5 40 0.3 336 75.6 43.2 37 54.3 1047 2067 17840 17859 50.8 45 4567 18223 18206 51.8 50 1 384 74.7 40.4 37 52.6 1048 2068 24480 24500 53.2 47.6 4568 24815 24792 53.4 41.7 0.2 336 75.6 43.2 37 54 1049 2069 17840 17859 50.8 45 4569 18231 18210 52.2 45.5 1.4 392 74.8 40.6 37 52.7 1050 2070 28821 28840 51.8 45 4570 29298 29279 52.6 55 0.8 478 77 45.2 37 54.6 1051 2071 24418 24440 55 47.8 4571 24517 24494 53.2 41.7 1.8 100 70.8 43 37 50.6 1052 2072 13701 13722 50.4 40.9 4572 14058 14040 51.4 52.6 1 358 74.5 40.2 37 52.4 1053 2073 28821 28840 51.8 45 4573 29358 29339 52.8 50 1 538 77.1 45 37 54.6 1054 2074 17792 17813 51.6 40.9 4574 18233 18214 52 50 0.4 442 75.1 40.7 37 53.1 1055 2075 24480 24440 50 42.9 4575 25079 25061 52.7 52.6 1.9 660 75.7 41.1 37 53.3 1056 2076 28821 28839 51.1 47.4 4576 29298 29279 52.6 55 1.5 478 77 45.2 37 54.3 1057 2077 3796 3814 50.8 52.6 4577 4434 4416 51.5 52.6 0.7 639 75.4 40.4 37 53.1 1058 2078 28821 28839 51.1 47.4 4578 29358 29339 52.8 50 1.7 538 77.1 45 37 54.4 1059 2079 28820 28838 53.7 52.6 4579 29298 29279 52.6 55 1.1 479 77.1 45.3 37 54.8 1060 2080 24418 24439 52.9 45.5 4580 25079 25061 52.7 52.6 0.2 662 75.8 41.2 37 54 1061 2081 28820 28838 53.7 52.6 4581 29358 29339 52.8 50 0.9 539 77.1 45.1 37 54.9 1062 2082 27369 27389 52.5 47.6 4582 27468 27451 51.1 50 1.4 100 71.2 44 38 50.3 1063 2083 7725 7742 50 50 4583 8187 8167 50.4 42.9 0.3 463 75.6 41.9 38 53 1064 2084 16549 16567 54.9 52.6 4584 17040 17021 53.4 50 1.5 492 75.9 42.3 38 54.2 1065 2085 3221 3239 51.5 52.6 4585 3500 3481 51.2 50 0.3 280 74.6 41.8 38 52.7 1066 2086 16549 16567 54.9 52.6 4586 17041 17022 54.1 50 0.8 493 75.8 42.2 38 54.4 1067 2087 20138 20158 50.1 42.9 4587 20615 20597 50.6 47.4 0.5 478 75 40.4 38 52.7 1068 2088 20078 20099 50.5 40.9 4588 20615 20597 50.6 47.4 0.1 538 75.3 40.5 38 52.9 1069 2089 13039 13057 51.1 52.6 4589 13325 13305 50.5 47.6 0.6 287 75.8 44.6 38 53.3 1070 2090 16549 16567 54.9 52.6 4590 17041 17023 53.5 52.6 1.4 493 75.8 42.2 38 54.2 1071 2091 13701 13725 53.6 40 4591 14124 14106 52.4 52.6 1.2 424 75.1 41 38 53.4 1072 2092 12975 12993 51.4 47.4 4592 13320 13300 51.4 47.6 0 346 76.1 44.2 38 53.8 1073 2093 16548 16566 54.9 52.6 4593 16779 16758 53.5 50 1.4 232 74 41.4 38 52.9 1074 2094 3361 3381 50.5 42.9 4594 3500 3481 51.2 50 0.7 140 74.1 46.4 38 52.1 1075 2095 3361 3381 50.5 42.9 4595 3503 3484 51.5 50 1 143 74.4 46.9 38 52.3 1076 2096 16368 16387 50.2 45 4596 16780 16760 51.4 42.9 1.2 413 74.9 40.7 38 52.6 1077 2097 7725 7742 50 50 4597 8188 8168 50.4 42.9 0.3 464 75.6 41.8 38 53 1078 2098 8867 8887 52.3 47.6 4598 9597 9573 53.4 40 1.1 731 75.9 41.2 38 53.9 1079 2099 2223 2244 51.4 45.5 4599 2672 2654 50.9 52.6 0.5 450 77 45.3 38 54.3 1080 2100 10242 10265 51.2 41.7 4600 10605 10588 51.1 50 0.2 364 74.5 40.1 38 52.6 1081 2101 8867 8888 52.7 45.5 4601 9253 9235 51.6 47.4 1.1 387 75.1 41.3 38 53.2 1082 2102 3361 3381 50.5 42.9 4602 3504 3485 50.4 45 0.1 144 74.3 46.5 38 52.2 1083 2103 98 118 50.6 42.9 4603 314 296 50.6 47.4 0 217 75.9 46.5 38 53.4 1084 2104 12233 12251 51.1 52.6 4604 12498 12480 50 47.4 1.1 266 74.8 42.5 38 52.5 1085 2105 9926 9944 50.5 52.6 4605 10455 10434 51.1 40.9 0.6 530 75.3 40.6 38 52.9 1086 2106 3360 3380 51.4 42.9 4606 3497 3478 51.3 50 0.1 138 74 46.4 38 52.3 1087 2107 9926 9944 50.5 52.6 4607 10455 10435 50.5 42.9 0 530 75.3 40.6 38

224 73.5 40.6 38 51.7 1098 2118 13176 13196 51.4 47.6 4618 13545 13526 52.9 55 1.5 370 77 46.2 38 54.4 1099 2119 11541 11562 51.5 40.9 4619 11983 11965
53 52.6 1.5 443 75 40.6 38 53.1 1100 2120 2429 2447 50.2 47.4 4620 3056 3038 50.8 52.6 0.6 628 76.3 42.7 38 53.6 1101 2121 11545 11563 50.8 47.4 4621 12258
12238 50.3 42.9 0.5 714 76.2 42 38 53.5 1102 2122 8868 8889 50.4 40.9 4622 9245 9226 50 45 0.4 378 74.9 41 38 52.6 1103 2123 27361 27380 52.4 55 4623
27466 27448 52.3 52.6 0.1 106 72.5 46.2 38 51.5 1104 2124 8861 8880 50.2 45 4624 9340 9319 50.8 45.5 0.6 480 75.5 41.5 38 53 1105 2125 1784 1802 51.8 52.6
4625 2113 2094 50.1 45 1.7 330 76 44.2 38 53.3 1106 2126 8868 8889 50.4 40.9 4626 9107 9086 51.6 45.5 1.2 240 74 41.3 38 52 1107 2127 19795 19814 50.4 45
4627 20099 20078 50.5 40.9 0 305 74.4 40.7 38 52.3 1108 2128 26708 26731 54.2 41.7 4628 27347 27324 52.3 41.7 1.9 640 75.6 40.8 38 53.7 1109 2129 19794
19813 50 50 4629 19920 19899 50.2 40.9 0.2 127 72.3 43.3 38 50.7 1110 2130 3031 3051 51.3 52.4 4630 3650 3631 53.1 50 1.8 620 76 42.5 38 54 1111 2131
3031 3051 51.3 52.4 4631 3647 3628 50.6 45 0.7 617 76.4 42.9 38 53.8 1112 2132 19794 19813 50 50 4632 19922 19902 50 42.9 0 129 72.5 43.4 38 50.8 1113
2133 12236 12256 51.2 42.9 4633 12994 12976 50.3 47.4 0.8 759 76.4 42.4 38 53.7 1114 2134 26708 26731 54.2 41.7 4634 27467 27449 52.8 47.4 1.4 760 76 41.3
38 54.1 1115 2135 19716 19737 52.2 45.5 4635 19922 19901 51.5 45.5 0.7 207 73.5 41.1 38 52 1116 2136 19715 19735 52.5 47.6 4636 19922 19901 51.5 45.5 0.9
208 73.6 41.3 38 52.1 1117 2137 3360 3379 50.7 45 4637 3503 3484 51.5 50 0.7 144 74.3 46.5 38 52.3 1118 2138 9055 19079 52.8 40 4638 9364 9346 53.9 52.6
1.1 310 75.3 42.9 38 53.7 1119 2139 1782 1801 52.7 50 4639 3881 1861 54.5 52.4 1.8 100 72.4 47 38 51.6 1120 2140 26708 26727 50 45 4640 27468 27450 51.9
47.4 1.8 761 75.9 41.3 38 53.3 1121 2141 26708 26727 50 45 4641 27468 27451 51.1 50 1.1 761 75.9 41.3 38 53.3 1122 2142 4593 4613 51.5 47.6 4642 4995 4975
51.7 42.9 0.1 403 76 43.4 38 53.8 1123 2143 19709 19730 51.3 40.9 4643 19930 19911 50.7 50 0.5 222 74 41.9 38 52.1 1124 2144 26421 26441 51.5 42.9 4644
26587 26570 50.2 50 1.3 167 72.3 40.1 38 50.8 1125 2145 18979 19000 51.6 45.5 4645 19217 19195 51.7 43.5 0 239 73.5 40.2 38 52.1 1126 2146 18703 18724
53.5 50 4646 19476 19453 53.5 41.7 0 774 75.6 40.3 38 54 1127 2147 4255 4276 51.7 45.5 4647 4708 4690 50.3 47.4 1.4 454 75.1 40.7 38 52.8 1128 2148 3232
3252 51.1 47.6 4648 3503 3484 51.5 50 0.4 272 74.6 41.9 38 56.6 1129 2149 26421 26441 51.5 42.9 4649 26656 26636 51.3 47.6 0.2 236 74.2 41.9 38 52.5 1130
2150 3232 3252 51.1 47.6 4650 3504 3485 50.4 45 0.7 273 74.6 41.8 38 52.4 1131 2151 26421 26441 51.5 42.9 4651 26660 26641 50.2 50 1.3 240 74.2 41.7 38
52.1 1132 2152 26421 26441 51.5 42.9 4652 26683 26665 52.7 52.6 1.2 263 74.8 42.6 38 52.9 1133 2153 26421 26441 51.5 42.9 4653 26686 26669 50.5 50 0.9 266
74.8 42.9 38 52.6 1134 2154 26421 26441 51.5 42.9 4654 26691 26673 51.3 47.4 0.1 271 74.8 42.4 38 52.9 1135 2155 18704 18724 50.8 47.6 4655 19476 19456
50.5 42.9 0.3 773 75.5 40.2 38 53.1 1136 2156 18704 18724 50.8 47.6 4656 19482 19463 50.1 45 0.7 779 75.5 40.2 38 53 1137 2157 942 960 52.1 52.6 4657 1498
1481 51 50 1.1 557 76.9 44.5 38 54.3 1138 2158 942 960 52.1 52.6 4658 1497 1480 50.3 50 1.9 556 77 44.6 38 54.1 1139 2159 13040 13059 50.9 50 4659 13312
13294 51 52.6 0.1 273 75.6 44.3 38 53.3 1140 2160 18696 18715 51.5 50 4660 19476 19453 53.5 41.7 1.8 781 75.6 40.3 38 53.5 1141 2161 18696 18715 51.7 50
4661 19476 19456 50.5 42.9 1.3 781 75.6 40.3 38 53.1 1142 2162 3232 3251 50.3 50 4662 3503 3484 51.5 50 1.1 272 74.6 41.9 38 52.4 1143 2163 3031 3051 51.3
52.4 4663 3646 3625 52 40.9 0.7 616 76.4 42.9 38 54 1144 2164 9130 9150 51.3 42.9 4664 9560 9541 50.9 45 0.4 431 75.3 41.3 38 53 1145 2165 18224 18243 53.1
50 4665 18696 18672 53.9 40 0.8 473 75.7 42.1 38 54 1146 2166 18224 18243 53.1 50 4666 18696 18673 53.4 41.7 0.3 473 75.7 42.1 38 54 1147 2167 18225
18243 51.4 52.6 4667 18697 18679 51.9 52.6 0.5 473 75.8 42.3 38 53.6 1148 2168 9130 9150 51.3 42.9 4668 9560 9540 51.6 42.9 0.3 431 75.3 41.3 38 53.2 1149
2169 8866 8885 51.1 45 4669 9252 9235 50.1 50 1 387 75.1 41.3 38 52.7

1150 2170 9130 9150 51.3 42.9 4670 9559 9539 50.6 42.9 0.7 430 75.3 41.4 38 53 1151 2171 12267 12290 54.5 41.7 4671 12501 12480 53.5 45.5 1 235 74.3 42.1
38 53.2 1152 2172 3427 3446 52.7 50 4672 3650 3631 53.1 50 0.4 224 74.3 42.4 38 52.9 1153 2173 3427 3446 52.7 50 4673 3648 3628 52.3 42.9 0.4 222 74 41.9
38 52.6 1154 2174 26039 26058 54 55 4674 26184 26164 52.4 42.9 1.6 146 71.8 40.4 38 51.1 1155 2175 3230 3249 50.1 45 4675 3503 3484 51.5 50 1.4 274 74.5
41.6 38 52.3 1156 2176 3230 3249 50.1 45 4676 3504 3485 50.4 45 0.3 275 74.4 41.5 38 52.2 1157 2177 3427 3446 52.7 50 4677 3646 3625 52 40.9 0.6 220 74
41.8 38 52.5 1158 2178 3429 3449 50.4 42.9 4678 3647 3628 50.6 45 0.2 219 73.9 41.6 38 51.9 1159 2179 3429 3449 50.4 42.9 4679 3646 3625 52 40.9 1.6 218
73.7 41.3 38 51.8 1160 2180 8866 8885 51.1 45 4680 9249 9231 51.8 47.4 0.3 384 75.1 41.4 38 52.9 1161 2181 3428 3449 52.8 45.5 4681 3650 3631 53.1 50 0.3
223 74.2 42.2 38 52.8 1162 2182 18077 18098 52.9 50 4682 18696 18672 53.9 40 1 620 76.2 42.4 38 54.3 1163 2183 18078 18098 51.5 47.6 4683 18696 18673
53.4 41.7 1.9 619 76.2 42.3 38 53.9 1164 2184 8866 8885 51.1 45 4684 9249 9230 51.5 45 0.4 384 75.1 41.4 38 53 1165 2185 3229 3248 50.5 50 4685 3503 3484
51.5 50 0.8 275 74.6 41.8 38 52.5 1166 2186 12267 12290 54.5 41.7 4686 12495 12476 52.7 45 1.9 229 74.1 41.9 38 52.8 1167 2187 8220 8240 54 47.6 4687 8929
8910 54.5 55 0.4 710 75.4 40 38 54.1 1168 2188 18080 18098 51.2 52.6 4688 18238 18219 50.3 45 0.9 159 74 44.7 38 52 1169 2189 18080 18098 51.2 52.6 4689
18239 18220 50 45 1.2 160 73.9 44.4 38 51.8 1170 2190 18080 18098 51.2 52.6 4690 18697 18679 51.9 52.6 0.7 618 76.3 42.6 38 53.8 1171 2191 18076 18097
53.1 45.5 4691 18712 18693 54.8 55 1.7 637 76.3 42.5 38 54.4 1172 2192 8866 8885 51.1 45 4692 9245 9226 50 45 1.1 380 75 41.1 38 52.6 1173 2193 943 961
50.3 47.4 4693 1498 1481 51 50 0.8 556 76.9 44.4 38 54 1174 2194 18075 18095 50.6 47.6 4694 18642 18622 50.5 42.9 0.1 568 76.2 42.6 38 53.6 1175 2195 18075
18095 50.6 47.6 4695 18662 18641 50.4 40.9 0.2 588 76.3 42.7 38 53.6 1176 2196 8866 8885 51.1 45 4696 9107 9086 51.6 45.5 0.5 242 74.1 41.2 38 52.3 1177
2197 943 961 50.3 47.4 4697 1497 1480 50.3 50 0.5 555 76.9 44.5 38 54 1178 2198 7400 7417 50.2 50 4698 8190 8172 50.3 47.4 0.1 791 76.4 42.2 38 53.6 1179
2199 13039 13058 51.8 50 4699 13314 13297 51 50 0.9 276 75.7 44.6 38 53.4 1180 2200 7725 7743 50.8 47.4 4700 8187 8167 50.4 42.9 0.5 463 75.6 41.9 38 53.1
1181 2201 18074 18094 51.1 42.9 4701 18642 18622 50.5 42.9 0.5 569 76.2 42.5 38 53.6 1182 2202 25782 25805 52.1 41.7 4702 26174 26153 51 40.9 1.1 393 74.8
40.5 38 52.8 1183 2203 9131 9151 50.4 42.9 4703 9560 9541 50.9 45 0.5 430 75.3 41.4 38 52.9 1184 2204 25782 25805 52.1 41.7 4704 26183 26162 52.8 45.5 0.7
402 74.7 40.2 38 53.1 1185 2205 9131 9151 50.4 42.9 4705 9560 9540 51.6 42.9 1.2 430 75.3 41.4 38 52.9 1186 2206 7725 7743 50.8 47.4 4706 8188 8168 50.4
42.9 0.5 464 75.6 41.8 38 53.1 1187 2207 985 1004 51.1 50 4707 1494 1476 50.7 47.4 0.4 510 76.5 43.7 38 53.9 1188 2208 13039 13058 51.8 50 4709 13323 13304
51.1 45 0.7 285 75.8 44.6 38 53.5 1189 2209 9131 9151 50.4 42.9 4709 9559 9539 50.6 42.9 0.3 429 75.3 41.5 38 52.9 1190 2210 12352 12375 52.9 41.7 4710
12499 12480 51.8 45 1.1 148 73.3 43.9 38 52 1191 2211 3225 3244 52.4 55 4711 3646 3625 52 40.9 0.4 422 75.4 41.7 38 53.5 1192 2212 25676 25697 51.9 40.9
4712 25784 25765 53.3 50 1.4 109 70.3 40.4 38 49.9 1193 2213 25676 25381 51.1 52.6 4713 25548 25531 51.1 50 0 186 73.7 42.5 38 52 1194 2214 25363 25381
51.1 52.6 4714 25645 25626 50.8 45 0.4 283 74.2 40.6 38 52.3 1195 2215 18074 18095 50.3 45 4715 18642 18622 50.5 42.9 0.2 569 76.2 42.5 38 53.5 1196 2216
3225 3244 52.4 55 4716 3647 3628 50.6 45 1.8 423 75.5 41.8 38 53.1 1197 2217 3225 3244 52.4 55 4717 3650 3631 53.1 50 0.7 426 75.5 42 38 53.7 1198 2218
12352 12375 52.9 41.7 4718 12494 12476 52.2 47.4 0.6 143 73.2 44.1 38 52 1199 2219 13039 13058 51.8 50 4719 13326 13306 50.7 42.9 1.2 288 75.8 44.4 38
53.4 1200 2220 7617 7636 50.9 50 4720 8188 8169 50.5 45 0.5 572 76.1 42.3 38 53.5 1201 2221 988 1006 52.2 52.6 4721 1697 1678 50.3 45 2 710 76.9 43.8 38 54
1202 2222 12232 12250 51.9 52.6 4722 12739 12719 50.3 42.9 1.7 508 75.8 42.1 38 53.3 1203 2223 12232 12250 51.9 52.6 4723 12739 12718 51 40.9 1 508 75.8
42.1 38 53.5 1204 2224 988 1006 52.2 52.6 4724 1697 1677 51 42.9 1.2 710 76.9 43.8 38 54.2 1205 2225 8867 8886 50.7 50 4725 9341 9322 51.1 50 0.5 475 75.7
41.9 38 53.3 1206 2226 3223 3242 51.8 55 4726 3650 3631 53.1 50 1.3 428 75.6 42.1 38 53.6 1207 2227 8867 8886 50.7 50 4727 9340 9319 50.8 45.5 0.1 474 75.6
71.8 38 53.2 1208 2228 988 1006 52.2 52.6 4728 1697 1676 51.7 40.9 0.6 710 76.9 43.8 38 54.4 1209 2229 988 1006 52.2 52.6 4729 1694 1673 51.7 40.9 0.5 707
41.9 43.8 38 54.5 1210 2230 988 1006 52.2 52.6 4730 1494 1476 50.7 47.4 1.5 507 76.5 43.8 38 53.9 1211 2231 9931 9950 50.2 45 4731 10455 10434 51.1 40.9 1
525 75.3 40.6 38 52.8 1212 2232 3224 3242 50.5 52.6 4732 3646 3625 52 40.9 1.5 423 75.4 41.6 38 53 1213 2233 3224 3242 50.5 52.6 4733 3647 3628 50.6 45 0.1
424 75.4 41.7 38 53.1 1214 2234 3016 3036 50.2 42.9 4734 3187 3166 50.3 46.5 0.1 172 74.6 45.3 38 52.4 1215 2235 24559 24579 52 52.4 4735 25182 25164 51.4
47.4 0.6 624 76 41.8 38 53.7 1216 2236 1782 1802 53.3 47.6 4736 1881 1861 51.5 52.4 1.2 100 72.4 47 38 51.8 1217 2237 7880 7900 50.3 42.9 4737 8188 8169
50.5 45 0.1 309 74.8 41.7 38 52.6 1218 2238 8861 8880 50.4 45 4738 9248 9229 50.1 45 0 388 75 41 38 52.6 1219 2239 8868 8889 50.4 40.9 4739 9312 9293 50.6
45 0.1 445 75.3 41.3 38 53 1220 2240 17790 17813 54.3 41.7 4740 18220 18201 56.1 55 1.8 431 74.9 40.4 38 53.8 1221 2241 24569 24590 56.6 54.5 4741 25184
25164 55.9 52.4 0.7 616 75.9 41.7 38 55 1222 2242 13176 13196 51.4 47.6 4742 13328 13307 51.2 45.5 0.2 153 73.4 43.8 38 51.9 1223 2243 8861 8880 50.2 45
4743 9254 9236 50.6 47.4 0.4 394 74.9 40.9 38 52.6 1224 2244 24622 24643 57.1 54.5 4744 25400 25377 57.2 50 0.1 779 75.7 40.7 38 55.2 1225 2245 8868 8889
50.4 40.9 4745 9256 9237 50.8 45 0.4 389 75 41.1 38 52.7 1226 2246 3361 3381 50.5 42.9 4746 3497 3478 51.3 50 0.8 137 74.1 46.7 38 52.1 1227 2247 4593 4613
51.5 47.6 4747 4711 4693 50.4 47.4 1.1 119 71.5 42 38 50.2 1228 2248 19911 19930 50.7 50 4748 20615 20597 50.6 47.4 0.1 705 75.5 40.3 38 53.1 1229 2249
3221 3239 51.5 52.6 4749 3497 3478 51.3 50 0.2 277 74.6 41.9 38 52.7 1230 2250 3223 3241 50.2 52.6 4750 3504 3485 50.4 45 0.2 282 74.8 42.2 38 52.5 1231
2251 3223 3241 50.2 52.6 4751 3503 3484 51.5 50 1.2 281 74.9 42.3 38 52.6 1232 2252 3360 3380 51.4 42.9 4752 3504 3485 50.4 45 1 145 74.2 46.2 38 52.2 1233
2253 4593 4613 51.5 47.6 4753 4711 4692 51.2 45 0.3 119 71.5 42 38 50.5 1234 2254 4593 4613 51.5 47.6 4754 4710 4691 50.2 45 1.4 118 71.6 42.4 38 50.2 1235
2255 3016 3036 50.2 42.9 4755 3186 3165 50.4 40.9 0.2 171 74.4 45 38 52.3 1236 2256 29182 29206 55.4 44 4756 29301 29282 55.3 55 0.1 120 73.4 46.7 38 53.1
1237 2257 29183 29206 52.9 41.7 4757 29306 29287 54.6 55 1.7 124 73.3 46 38 52.3 1238 2258 29186 29206 51.3 42.9 4758 29298 29279 52.6 55 1.3 113 72.8 46
38 51.5 1239 2259 16979 17000 52.6 50 4759 17483 17465 54.4 52.4 1.8 505 75.9 42.2 38 54 1240 2260 29182 29206 51.6 41.7 4760 29298 29279 52.6 55 1.9 117
73.1 46.2 38 52 1241 2261 16981 17000 51.3 50 4761 17111 17090 51.1 40.9 0.2 131 74.5 48.1 38 52.6 1242 2262 13057 13197 50.3 42.9 4762 13949 13932 51.6
50 1.3 773 75.8 41 38 53.3 1243 2263 8867 8887 52.3 47.6 4763 9252 9234 51.4 52.6 0.9 386 75.1 41.5 38 53.1 1244 2264 24420 24440 50.8 42.9 4764 25081
25063 52.4 52.6 1.6 662 75.7 40.9 38 53.3 1245 2265 7727 7745 50.8 47.4 4765 8188 8169 50.5 45 0.4 462 75.6 41.8 38 53.1 1246 2266 2387 2405 51.6 52.6 4766
3055 3036 50.6 50 1.1 669 76.7 43.3 38 53.9 1247 2267 2671 2692 52.1 40.9 4767 3055 3036 50.6 50 1.5 385 74.8 40.5 38 52.6 1248 2268 29182 29202 51.2 42.9
4068 29298 29279 52.6 55 1.4 117 73.1 46.2 38 51.6 1249 2269 24418 24439 52.9 45.5 4769 25081 25063 52.4 52.6 0.5 664 75.7 41.1 38 53.8 1250 2270 12373
12391 50.8 47.4 4770 12992 12974 51.2 52.

44 1.9 225 76.4 47.6 38 54.8 1262 2282 24379 24398 55 55 4782 25080 25061 54.1 50 1 702 75.9 41.3 38 54.4 1263 2283 24379 24398 55 55 4783 25080 25062
53.5 52.6 1.6 702 75.9 41.3 38 54.3 1264 2284 16875 16895 51.6 47.6 4784 17062 17045 50.2 50 1.4 188 74.4 44.1 38 52.2 1265 2285 12726 12746 51.3 47.6 4785
12998 12979 50.1 45 1.2 273 75.2 43.2 38 52.7 1266 2286 24378 24397 55 55 4786 24517 24494 53.2 41.7 1.8 140 72.7 42.9 38 51.9 1267 2287 24378 24397 55
55 4787 25080 25061 54.1 50 1 703 75.9 41.3 38 54.4 1268 2288 28939 28961 55.2 47.8 4788 29306 29285 56.7 54.5 1.5 368 76.6 45.1 38 55.3 1269 2289 28940
28961 53.1 45.5 4809 29306 29287 54.5 55 1.5 367 76.5 45 38 54.6 1270 2290 28941 28961 51.6 42.9 4790 29298 29279 52.6 55 1 358 76.3 44.7 38 54 1271 2291
28178 28200 52 43.5 4791 28284 28265 52.9 50 0.9 107 74.7 51.4 38 53 1272 2292 28941 28961 51.6 42.9 4792 29358 29339 52.8 50 1.2 418 76.5 44.5 38 54.2
1273 2293 24378 24397 55 55 4793 25080 25062 53.5 52.6 1.6 703 75.9 41.3 38 54.2 1274 2294 28938 28960 56.1 47.8 4794 29306 29285 56.7 54.5 0.6 369 76.5
45 38 55.5 1275 2295 12234 12252 50.6 47.4 4795 12498 12480 50 47.4 0.5 265 74.7 42.3 38 52.4 1276 2296 28939 28960 54.7 50 4796 29306 29287 54.6 55 0.1
368 76.6 45.1 38 55.1 1277 2297 28140 28158 54.1 52.6 4797 28411 28393 52.9 52.6 1.1 272 78.8 52.2 38 56.2

1278 2298 28941 28960 50.9 45 4798 29298 29279 52.6 55 1.7 358 76.3 44.7 38 53.8 1279 2299 28140 28158 54.1 52.6 4799 28416 28396 52.4 47.6 1.7 277 78.8
52 38 56 1280 2300 28941 28960 50.9 45 4800 29358 29339 52.8 50 1.9 418 76.5 44.8 38 53.9 1281 2301 24179 24200 53.3 40.9 4801 24815 24791 54.5 40 1.2
637 75.8 41.3 38 54.1 1282 2302 28938 28956 50.8 47.4 4802 29298 29279 52.6 55 1.8 361 76.4 44.9 38 53.8 1283 2303 12726 12746 51.3 47.6 4803 12992 12974
51.2 52.6 0.1 267 75.2 43.4 38 53.1 1284 2304 16874 16893 52.1 50 4804 17062 17045 50.2 50 1.9 189 74.6 44.4 38 52.3 1285 2305 1352 1371 56.1 55 4805 1484
1464 54.3 47.6 1.8 133 74.9 48.9 38 53.8 1286 2306 11540 11561 53.8 45.5 4806 11983 11965 53 52.6 0.7 444 75.1 40.8 38 53.6 1287 2307 24179 24199 52.7 42.9
4807 24815 24792 53.4 41.7 0.7 637 75.8 41.3 38 53.9 1288 2308 16555 16572 50.3 50 4808 16777 16758 51.5 50 1.2 223 73.6 40.8 38 51.7 1289 2309 24178
24198 52.7 42.9 4809 24815 24791 54.5 50 1.8 638 75.7 41.2 38 53.9 1290 2310 3192 3213 51.8 45.5 4810 3650 3631 53.1 50 1.3 459 75.7 42 38 53.6 1291 2311
3192 3213 51.8 45.5 4811 3647 3628 50.6 45 1.2 456 75.6 41.9 38 53.2 1292 2312 24174 24195 52.5 40.9 4812 24815 24792 53.4 41.7 0.9 642 75.8 41.3 38 53.9
1293 2313 16553 16571 53.4 52.6 4813 16780 16760 51.4 42.9 2 228 73.7 40.8 38 52.1 1294 2314 16550 16568 54.1 52.6 4814 17041 17023 53.5 52.6 0.6 492
75.9 42.3 38 54.3 1295 2315 1922 3213 51.8 45.5 4815 3646 3625 52 40.9 0.2 455 75.5 41.8 38 53.5 1296 2316 16551 16568 51.1 50 4816 16777 16758 51.5 50
0.4 227 73.9 41.4 38 52.2 1297 2317 12373 12391 50.8 47.4 4817 12998 12979 50.1 45 0.7 626 76.4 43 38 53.6 1298 2318 28868 28887 50.7 45 4818 29414 29395
50.5 50 0.2 547 77 44.8 38 54.2 1299 2319 24028 24047 53.8 50 4819 24815 24791 54.5 40 0.7 788 76.3 42 38 54.6 1300 2320 2427 2445 52.1 52.6 4820 3056
3038 50.8 52.6 1.3 630 76.4 42.9 38 53.8 1301 2321 28867 28886 53.2 50 4821 29306 29288 53.5 52.6 0.3 440 76.9 45.2 38 54.9 1302 2322 24021 24044 52.8 41.7
4822 24815 24791 54.5 40 1.6 795 76.2 41.9 38 54.3 1303 2323 28867 28885 51.5 52.6 4822 29414 29395 50.5 50 0.9 548 77.1 44.9 38 54.2 1304 2324 12369
12388 50.6 45 4824 13155 13137 52.1 52.6 1.5 787 76.8 43.3 38 54 1305 2325 27368 27392 58.2 48 4825 27467 27443 59 48 1.2 100 71.2 44 38 52.4 1306 2326
27369 27392 57.2 50 4826 27468 27444 58.4 44 1.2 100 71.2 44 38 52.1 1307 2327 27369 27392 57.2 50 4827 27468 27445 58.1 45.8 0.8 100 71.2 44 38 52.1
1308 2328 23841 23863 53.7 47.8 4828 24022 24003 55.5 55 1.7 182 74.4 44.5 38 53.3 1309 2329 3192 3213 51.8 45.5 4829 3497 3478 51.3 50 0.5 306 75 42.2 38
53 1310 2330 23843 23863 50.3 42.9 4830 24526 24506 50.3 42.9 0 684 76.1 41.8 38 53.4 1311 2331 27366 27389 56.1 45.8 4831 27465 27443 47.8 0.3 100
71.2 44 38 51.8 1312 2332 27366 27389 56.1 45.8 4832 27465 27444 55.6 45.5 0.6 100 71.2 44 38 51.6 1313 2333 27366 27389 56.1 45.8 4833 27465 27445 55.1
47.6 1 100 71.2 44 38 51.5 1314 2334 16549 16567 54.9 52.6 4834 16779 16758 53.5 50 1.4 231 74 41.6 38 53 1315 2335 27369 27389 52.5 47.6 4835 27468
27448 53.7 47.6 1.1 100 71.2 44 38 50.7 1316 2336 27369 27389 52.5 47.6 4836 27468 27449 52.6 45 0 100 71.2 44 38 50.7 1317 2337 27369 27389 52.5 47.6
4837 27468 27450 51.9 47.4 0.7 100 71.2 44 38 50.5 1318 2338 28654 28672 50.6 52.6 4838 29412 29393 50.3 45 0.2 759 77.9 46.1 38 54.7 1319 2339 2429 2447
50.2 47.4 4839 3053 3034 50.4 50 0.1 625 76.3 42.6 39 53.6 1320 2340 1442 1461 51.6 55 4840 1697 1676 51.7 40.9 0 256 75.8 45.3 39 53.7 1321 2341 1442 1461
51.6 55 4841 1697 1677 51 42.9 0.6 256 75.8 45.3 39 53.5 1322 2342 1442 1461 51.6 55 4842 1697 1678 50.3 45 1.3 256 75.8 45.3 39 53.3 1323 2343 3214 3233
51.1 50 4843 3504 3485 50.4 45 0.7 291 74.8 41.9 39 52.6 1324 2344 3214 3233 51.1 50 4844 3503 3484 51.5 50 0.4 290 74.8 42.1 39 52.8 1325 2345 27374
27392 50.6 47.4 4845 27674 27653 52.5 40.9 1.9 301 74.1 40.2 39 52.2 1326 2346 9930 9949 52.2 50 4846 10670 10649 51.3 40.9 0.9 741 75.8 40 39 53.5 1327
2347 1442 1461 51.6 55 4847 2103 2083 50.6 42.9 1 662 76.7 43.4 39 53.9 1328 2348 8867 8887 52.3 47.6 4848 9375 9354 50.4 40.9 2 509 75.7 41.8 39 53.2 1329
2349 16367 16386 51.4 50 4849 16775 16755 51.1 42.9 0.3 409 75 40.8 39 52.9 1330 2350 18081 18100 51.7 50 4850 18702 18685 50.2 50 1.5 622 76.2 42.4 39
53.5 1331 2351 18083 18102 50.6 45 4851 18702 18685 50.2 50 1.0 620 76.1 42.3 39 53.4 1332 2352 18094 18113 51 50 4852 18702 18685 50.2 50 0.8 609 76.1
42.2 39 53.4 1333 2353 8865 8884 50.4 45 4853 9254 9236 50.6 47.4 0.2 390 75 41 39 52.7 1334 2354 16367 16386 51.4 50 4854 16774 16754 50.4 42.9 1 408 75
40.9 39 52.7 1335 2355 18008 18028 53 52.4 4855 18220 18202 54.8 52.6 1.9 213 74.4 43.2 39 53.1 1336 2356 27369 27389 52.5 47.6 4856 27674 27653 52.5
40.9 0.1 306 74.3 40.5 39 52.9 1337 2357 16367 16386 51.4 50 4857 16774 16753 51.1 40.9 0.3 408 75 40.9 39 52.9 1338 2358 1442 1461 51.6 55 4858 2113 2094
50.1 45 1.5 672 76.7 43.3 39 53.8 1339 2359 7876 7895 51.5 45 4859 8190 8172 50.3 47.4 1.2 315 75.1 42.2 39 52.7 1340 2360 18696 18715 51.7 50 4860 19482
19463 50.1 45 1.7 787 75.6 40.3 39 53 1341 2361 12370 12388 50.1 47.4 4861 12911 12892 50.5 50 0.4 542 76.1 42.4 39 53.4 1342 2362 887 905 50.1 47.4 4862
1493 1473 52 47.6 1.9 607 77.1 44.6 39 54.1 1343 2363 16367 16387 51.8 47.6 4863 16774 16751 53.6 41.7 1.8 408 75 40.9 39 53.2 1344 2364 16378 16397 50.4
45 4864 17111 17090 51.1 40.9 0.7 734 76.3 42.2 39 53.6 1345 2365 16378 16397 50.4 45 4865 16781 16761 51.3 47.6 0.8 404 75.1 41.1 39 52.8 1346 2366 1402
1425 52.8 41.7 4866 1501 1478 54.6 41.7 1.8 100 72 46 39 51.3 1347 2367 16378 16397 50.4 45 4867 16777 16758 51.5 50 1 400 75 41 39 52.7 1348 2368 16378
16397 50.4 45 4868 16775 16756 50.3 45 0.1 398 75 41 39 52.7 1349 2369 16378 16397 50.4 45 4869 16775 16755 51.1 42.9 0.6 398 75 41 39 52.7 1350 2370
16378 16397 50.4 45 4870 16774 16754 50.4 42.9 0 397 75 41 39 52.7 1351 2371 16378 16397 50.4 45 4871 16774 16753 51.1 40.9 0.7 397 75 41.1 39 52.8
1352 2372 16378 16397 50.4 45 4872 16774 16752 52.2 43.5 1.8 397 75 41.1 39 52.8 1353 2373 10250 10274 51.6 40 4873 10608 10589 51 50 0.6 359 74.6 40.4
39 52.6 1354 2374 16548 16566 54.9 52.6 4874 17112 17090 53.3 43.5 1.6 565 76.3 42.8 39 54.5 1355 2375 19709 19730 51.3 40.9 4875 19922 19902 50 42.9 1.2
214 73.8 41.6 39 51.8 1356 2376 3218 3237 50.5 45 4876 3504 3485 50.4 45 0.1 287 74.7 41.8 39 52.5 1357 2377 3218 3237 50.5 45 4877 3503 3484 51.5 50 0.9
286 74.7 42 39 52.6 1358 2378 19709 19730 51.3 40.9 4878 19920 19899 50.2 40.9 1.1 212 73.7 41.5 39 51.8 1359 2379 1402 1422 50.2 42.9 4879 1501 1480 51.9
40.9 1.7 100 72 46 39 50.6 1360 2380 1402 1422 50.2 42.9 4880 1501 1481 51.2 42.9 1.1 100 72 46 39 50.6 1361 2381 8867 8886 50.7 50 4881 9249 9230 51.5 45
0.9 383 75.2 41.5 39 52.9 1362 2382 19794 19813 50 4882 19928 19908 52 52.4 2 135 72.8 43.7 39 51.1 1363 2383 8867 8886 50.7 50 4883 9249 9231 50.8
47.4 0.2 383 75.2 41.5 39 52.9 1364 2384 9927 9945 50.8 52.6 4884 10183 10165 51.7 47.4 0.9 257 75.3 44 39 53.1 1365 2385 27366 27384 52.2 52.6 4885 27566
27546 50.7 47.6 1.5 201 74.7 44.3 39 52.6 1366 2386 9927 9945 50.8 52.6 4886 10183 10166 50.9 50 0.1 257 75.3 44 39 53.1 1367 2387 27366 27384 52.2 52.6
4887 27568 27548 50.2 42.9 1.9 203 74.6 43.8 39 52.4 1368 2388 27366 27384 52.2 52.6 4888 27571 27551 51.4 42.9 0.8 206 74.5 43.7 39 52.7 1369 2389 887
905 50.1 47.4 4889 1483 1465 50.5 47.4 0.4 597 77 44.6 39 54.1 1370 2390 27366 27384 52.2 52.6 4890 27579 27558 51.1 40.9 1.1 214 74.9 44.4 39 52.9 1371
2391 16549 16567 54.9 52.6 4891 16774 16751 53.6 41.7 1.3 226 74 41.6 39 53 1372 2392 19794 19813 50 4892 19916 19895 50 45 0.2 123 72.1 43.1 39
50.6 1373 2393 16551 16568 51.1 50 4893 17062 17045 50.2 50 0.9 512 76 42.4 39 53.3 1374 2394 12756 12746 51.3 47.6 4894 13155 13137 52.1 52.6 0.8 430
76.4 44 39 53.9 1375 2395 545 564 50.7 50 4895 1171 1153 50.4 47.4 0.3 627 78.2 47.2 39 54.9 1376 2396 887 905 50.1 47.4 4896 1483 1464 51.3 45 1.2 597 77
44.6 39 54.1 1377 2397 9927 9945 50.8 52.6 4897 10356 10336 52.4 47.6 1.6 430 75.6 42.1 39 53.3 1378 2398 887 905 50.1 47.4 4898 1481 1463 50.5 47.4 0.4
595 77 44.5 39 54.1 1379 2399 12726 12746 51.3 47.6 4899 12911 12891 51.2 47.6 0.1 186 73.5 41.9 39 51.9 1380 2400 19795 19814 50.4 45 4900 19917 19896
50.9 45.5 0.5 123 72.1 43.1 39 50.7 1381 2401 27366 27380 52.4 55 4901 27562 27546 50.7 47.6 1.7 206 75.1 45.1 39 52.9 1382 2402 27366 27380 52.4 55 4902
27569 27548 50.9 40.9 1.5 209 74.9 44.5 39 52.8 1383 2403 27361 27380 52.4 55 4903 27571 27551 51.4 42.9 1 211 75 44.5 39 53 1384 2404 8867 8886 50.7 50
4904 9256 9237 50.8 45 0.1 390 75.1 41.3 39 52.9 1385 2405 8373 8391 50.7 47.4 4905 9109 9087 50.5 43.5 0.1 737 75.4 40 39 53 1386 2406 19800 19817 50.4
50 4906 19927 19908 52.1 55 1.7 128 72.6 43.8 39 51 1387 2407 19800 19817 50.4 50 4907 19924 19905 50.1 50 0.3 125 72.2 43.2 39 50.7 1388 2408 16553
16571 53.4 52.6 4908 16774 16751 53.6 41.7 0.3 222 73.7 41 39 52.7 1389 2409 2427 2445 52.1 52.6 4909 3053 3034 50.3 50 1.8 627 76.4 42.7 39 53.6 1390 2410
887 905 50.1 47.4 4910 1479 1460 51.6 50 1.5 593 77.1 44.7 39 54.1 1391 2411 13177 13197 50.3 42.9 4911 13321 13301 50.3 42.9 0 145 73.1 43.4 39 51.3 1392
2412 8374 8395 52.4 45.5 4912 9109 9087 50.5 43.5 1.9 736 75.4 40.1 39 53.1 1393 2413 9926 9944 50.5 52.6 4913 10183 10165 51.7 47.4 1.2 258 75.2 45.8 39 52.9
52.9 1394 2414 16562 16580 51.9 52.6 4914 17056 17035 51.8 45.5 0.1 495 75.8 42 39 53.7 1395 2415 16562 16581 52.6 50 4915 17056 17035 51.8 45 0.8 495
75.8 42 39 53.7 1396 2416 9926 9944 50.5 52.6 4916 10183 10166 50.9 50 1.0 428 75.2 43.8 39 52.9 1397 2417 13177 13197 50.3 42.9 4917 13325 13305 50.5
47.6 0.2 149 73.3 43.6 39 51.5 1398 2418 10141 10160 51 45 4918 10356 10336 52.4 47.6 1.4 216 73.5 40.7 39 51.8 1399 2419 2823 2844 50.4 45.5 4919 3185
3164 51 45.5 0.5 363 75.6 42.7 39 53.1 1400 2420 19800 19818 52.1 52.6 4920 19916 19895 50.2 40.9 1.9 117 71.7 42.7 39 50.3 1401 2421 8063 8084 51.4 45.5
4921 8189 8170 50.6 50 0.8 127 72.3 43.3 39 50.9 1402 2422 985 1008 56.1 50 4922 1485 1465 56 52.4 0 501 76.5 43.7 39 55.4 1403 2423 985 1008 56.1 50 4923
1485 1466 55.6 55 0.5 501 76.5 43.7 39 55.3

1404 2424 985 1008 56.1 50 4924 1495 1474 55.1 45.5 1 511 76.5 43.6 39 55.2 1405 2425 18017 18036 54.8 55 4925 18231 18209 53.5 47.8 1.3 215 74.5 43.3 39
53.3 1406 2426 985 1008 56.1 50 4926 1497 1476 56.4 50 0.3 513 76.6 43.9 39 55.5 1407 2427 13039 13057 51.1 52.6 4927 13155 13137 52.1 52.6 1 117 73.4 47
39 51.8 1408 2428 985 1008 56.1 50 4928 1498 1478 54.9 47.6 1.2 514 76.5 43.8 39 55.1 1409 2429 988 1006 52.2 52.6 4929 1496 1478 50.4 47.4 1.9 509 76.5
43.8 39 53.8 1410 2430 988 1006 52.2 52.6 4930 1497 1480 50.3 50 2 510 76.6 43.9 39 53.8 1411 2431 19856 19875 50.2 45 4931 20033 20016 50.4 50 0.2 178
74.1 43.8 39 52 1412 2432 988 1006 52.2 52.6 4932 1498 1481 51 50 1.2 511 76.6 43.8 39 54 1413 2433 3361 3382 51.9 45.5 4933 3650 3631 53.1 50 1.2

4941 18220 18202 54.8 52.6 0.9 210 74.5 43.3 39 53.7 1422 2442 18014 18032 51 52.6 4942 18223 18206 51.8 50 0.8 210 74.3 42.9 39 52.4 1423 2443 24630
24648 50.8 52.6 4943 25398 25378 51.1 42.9 0.2 769 75.6 40.4 39 53.3 1424 2444 18014 18032 51 52.6 4944 18231 18210 52.2 45.5 1.2 218 74.5 43.1 39 52.5
1425 2445 18014 18032 51 52.6 4945 18233 18214 52 50 1.1 220 74.7 43.6 39 52.7 1426 2446 18014 18032 51 52.6 4946 18233 18215 51.3 52.6 0.4 220 74.7 43.6
39 52.7 1427 2447 18011 18031 54.5 52.4 4947 18220 18201 56.1 55 1.6 210 74.5 43.3 39 53.6 1428 2448 3361 3382 51.9 45.5 4948 3646 3625 52 40.9 0.1 286
75.5 43.7 39 53.5 1429 2449 4658 4677 50.5 50 4949 5306 5288 52.4 52.6 2 649 75.5 40.7 39 53.1 1430 2450 18012 18031 53.2 55 4950 18223 18205 52.3 52.6
0.2 212 74.5 43.4 39 53.2 1431 2451 18012 18031 53.2 55 4951 18712 18693 54.8 55 1.7 701 76.4 42.7 39 54.6 1432 2452 13040 13059 50.9 50 4952 13325 13305
50.5 47.6 0.4 286 75.7 44.4 39 53.3 1433 2453 8867 8888 52.7 45.5 4953 9249 9231 50.8 47.4 1.9 383 75.2 41.5 39 53 1434 2454 24179 24198 51 45 4954 24740
24717 52.5 41.7 1.4 562 76 42.2 39 53.6 1435 2455 18013 18031 50.6 52.6 4955 18229 18209 50.1 42.9 0.5 217 74.4 42.9 39 52.2 1436 2456 8865 8884 50.4 45
4956 9340 9319 50.8 45.5 0.3 476 75.5 41.6 39 53.1 1437 2457 24558 24577 50.7 50 4957 24936 24919 51.8 50 1.1 379 75.8 43 39 53.3 1438 2458 8867 8888 52.7
45.5 4958 9249 9230 51.5 45 1.2 383 75.2 41.5 39 53.2 1439 2459 26039 26058 54 55 4959 26753 26733 54 52.4 0.1 715 76 41.5 39 54.5 1440 2460 26039 26058
54 55 4960 26753 26734 52.6 55 1.4 715 76 41.5 39 54.1 1441 2461 18009 18028 51.6 55 4961 18223 18206 51.8 50 0.1 215 74.5 43.3 39 52.7 1442 2462 24482
24503 51.6 40.9 4962 25080 25062 53.5 52.6 1.8 599 75.5 40.7 39 53.4 1443 2463 8861 8880 50.2 45 4963 9109 9087 50.5 43.5 0.4 249 73.8 40.6 39 51.8 1444
2464 24483 24501 51 42.9 4964 25086 25069 50.3 50 0.6 604 75.5 40.7 39 53 1445 2465 18011 18030 52.9 55 4965 18220 18202 54.8 52.6 2 210 74.5 43.3 39
53.1 1446 2466 24481 24502 51.5 45.5 4966 24815 24792 53.4 41.7 1.9 335 75.5 43 39 53.4 1447 2467 24481 24502 51.5 45.5 4967 25081 25063 52.4 52.6 0.9
601 75.5 40.8 39 53.4 1448 2468 24482 24502 50.3 42.9 4968 25082 25064 51.1 52.6 0.8 601 75.5 40.8 39 53 1449 2469 24482 24502 50.3 42.9 4969 25085 25068
50.3 50 0 604 75.4 40.6 39 53 1450 2470 24482 24502 50.3 42.9 4970 25086 25069 50.3 50 0 605 75.5 40.7 39 53 1451 2471 18011 18030 52.9 55 4971 18223
18206 51.8 50 1.1 213 74.4 43.2 39 52.7 1452 2472 18011 18030 52.9 55 4972 18231 18210 52.2 45.5 0.7 221 74.7 43.9 39 53 1453 2473 18011 18030 52.9 55
4973 18233 18214 52 50 0.9 223 74.9 43.9 39 53.1 1454 2474 18011 18030 52.9 55 4974 18233 18215 51.3 52.6 1.6 223 74.9 43.9 39 52.9 1455 2475 24419 24440
52.3 45.5 4975 24815 24792 53.4 41.7 1.2 397 75.9 43.1 39 53.9 1456 2476 18008 18029 54.5 50 4976 18220 18201 56.1 55 1.6 213 74.4 43.2 39 53.6 1457 2477
24420 24440 50.8 42.9 4977 24527 24507 51 42.9 0.2 108 70.7 41.7 39 49.9 1458 2478 12232 12250 51.9 52.6 4978 12994 12976 50.3 47.4 1.6 763 76.4 42.5 39
53.7 1459 2479 4644 4665 52.5 45.5 4979 5306 5288 52.4 52.6 0.1 663 75.6 40.9 39 53.8 1460 2480 18009 18029 53.3 52.4 4980 18712 18693 54.8 55 1.6 704
76.4 42.6 39 54.6 1461 2481 18010 18029 51.8 50 4981 18223 18205 53.3 52.6 1.5 214 74.4 43 39 52.7 1462 2482 24418 24439 52.9 45.5 4982 24527 24507 51
42.9 1.9 110 71.3 42.7 39 50.3 1463 2483 24418 24439 52.9 45.5 4983 24815 24792 53.4 41.7 0.5 398 75.9 43.2 39 54.1 1464 2484 9351 9370 51.2 50 4984 10017
9999 52.8 52.6 1.6 667 75.7 40.9 39 53.4 1465 2485 18011 18029 51.3 52.6 4985 18229 18209 50.1 42.9 1.2 219 74.4 42.9 39 52.2 1466 2486 13176 13196 51.4
47.6 4986 13314 13297 51 50 0.4 139 73.9 43 39 51.5 1467 2487 3229 3248 50.6 50 4987 3497 3478 51.3 50 0.6 269 74.5 41.6 39 52.4 1468 2488 25772 25793
52.4 40.9 4988 26182 26161 51.2 40.9 1.2 411 74.7 40.1 39 52.8 1469 2489 3229 3248 50.6 50 4989 3500 3481 51.2 50 0.5 272 74.5 41.5 39 52.4 1470 2490 13176
13196 51.4 47.6 4990 13323 13304 51.1 45 0.3 148 73.3 43.9 39 51.8 1471 2491 25771 25790 51.1 45 4991 26183 26163 51.7 42.9 0.6 413 74.8 40.4 39 52.8 1472
2492 24418 24436 50 47.4 4992 24526 24506 50.3 42.9 0.3 109 71.4 43.1 39 50.1 1473 2493 25769 25786 50.3 50 4993 26182 26161 51.2 40.9 0.9 414 74.8 40.3
39 52.6 1474 2494 18009 18028 51.6 55 4994 18231 18210 52.2 45.5 0.6 223 74.7 43.5 39 52.9 1475 2495 18009 18028 51.6 55 4995 18233 18214 52 50 0.4 225
74.9 44 39 53 1476 2496 24418 24436 50 47.4 4996 25082 25064 51.1 52.6 1.1 665 75.8 41.2 39 53.2 1477 2497 18009 18028 51.6 55 4997 18233 18215 51.3 52.6
0.3 225 74.9 44 39 53 1478 2498 24418 24436 50 47.4 4998 25209 25190 50.6 50 0.6 792 76.2 41.9 39 53.5 1479 2499 25363 25381 51.1 52.6 4999 25650 25631
51.3 45 0.1 288 74.2 40.6 39 52.4 1480 2500 25363 25381 51.1 52.6 5000 25651 25634 50.4 50 0.7 289 74.3 40.8 39 52.4 1481 2501 25354 25372 50.9 52.6 5001
25548 25531 51.1 50 0.2 195 74.1 43.1 39 52.2 1482 2502 18005 18024 51.1 50 5002 18223 18206 51.8 50 0.6 219 74.4 42.9 39 52.5 1483 2503 18005 18024 51.1
50 5003 18231 18210 52.2 45.5 1.1 227 74.6 43.2 39 52.7 1484 2504 25354 25372 50.9 52.6 5004 25651 25632 52.7 50 1.8 298 74.6 41.3 39 52.6 1485 2505 18005
18024 51.1 50 5005 18233 18215 51.3 52.6 0.2 229 74.9 43.7 39 52.8 1486 2506 18003 18023 53.5 52.4 5006 18712 18693 54.8 55 1.3 710 76.4 42.7 39 54.7 1487
2507 13176 13196 51.4 47.6 5007 13326 13306 50.7 42.9 0.1 151 73.4 43.7 39 51.7 1488 2508 8868 8889 50.4 40.9 5008 9311 9292 50.7 50 0.3 444 75.4 41.4 39
53 1489 2509 25354 25372 50.9 52.6 5009 25832 25811 52.1 50 1.2 479 75 40.3 39 52.9 1490 2510 8375 8396 51.8 45.5 5010 9109 9087 50.5 43.5 1.2 735 75.4 40
39 53 1491 2511 9918 9938 51.4 47.6 5011 10017 9999 52.8 52.6 1.3 100 72.4 47 39 51.2 1492 2512 8375 8396 51.8 45.5 5012 8933 8916 52.2 50 0.4 559 75.1
40.1 39 53.2 1493 2513 17840 17859 50.8 45 5013 18632 18611 50.2 40.9 0.6 793 76.1 41.5 39 53.4 1494 2514 13040 13059 50.9 50 5014 13155 13138 50.4 50
0.5 116 73.2 46.6 39 51.4 1495 2515 25348 25366 51.2 47.4 5015 25650 25631 51.3 45 0.1 303 74.6 41.3 39 52.7 1496 2516 25348 25366 51.2 47.4 5016 25651
25634 50.4 50 0.7 304 74.7 41.4 39 52.5 1497 2517 13040 13059 50.9 50 5017 13178 13157 50.4 40.9 0.5 139 73.6 45.3 39 51.7 1498 2518 17792 17813 51.6 40.9
5018 18223 18205 53.3 52.6 1.7 432 74.9 40.3 39 53 1499 2519 25348 25366 51.2 47.4 5019 25832 25811 52.1 50 0.9 485 75.1 40.4 39 53 1500 2520 25348 25366
51.2 47.4 5020 25833 25812 51.4 45.5 0.2 486 75 40.3 39 53 1501 2521 25347 25365 52 52.6 5021 25651 25632 52.7 50 0.7 305 74.8 41.6 39 53 1502 2522 8868
8889 50.4 40.9 5022 9252 9234 51.4 52.6 1 385 75.1 41.3 39 52.8 1503 2523 17793 17813 50 42.9 5023 18229 18209 50.1 42.9 0.1 437 74.9 40.3 39 52.5 1504
2524 17793 17813 50 42.9 5024 18231 18211 50.6 47.6 0.6 439 75 40.9 39 53.2 1505 2525 17793 17813 50 42.9 5025 18234 18216 51 52.6 1 442 75.1 40.7 39
52.7 1506 2526 17793 17813 50 42.9 5026 18238 18219 50.3 45 0.2 446 75.1 40.8 39 52.7 1507 2527 17793 17813 50 42.9 5027 18239 18220 50 45 0 447 75.1
40.7 39 52.7 1508 2528 24180 24199 50.3 40 5028 24938 24921 50.4 50 0.1 759 75.8 40.8 39 53.2 1509 2529 25348 25365 50.4 50 5029 25832 25811 52.1 50 1.7
485 75.1 40.4 39 52.8 1510 2530 25068 25085 50.3 50 5030 25182 25164 51.4 47.4 1.1 115 73.3 47 39 51.5 1511 2531 29260 29278 51.3 47.4 5031 29414 29395
50.5 50 0.8 155 74.3 45.8 39 52.3 1512 2532 24179 24198 51 45 5032 24933 24913 51.1 42.9 0.1 755 75.8 40.9 39 53.5 1513 2533 17790 17811 51.6 40.9 5033
18223 18205 53.3 52.6 1.7 434 74.9 40.3 39 53 1514 2534 8063 8084 51.4 45.5 5034 8190 8172 50.3 47.4 1.1 128 72.2 43 39 50.8 1515 2535 24178 24197 50.3 40
5035 24936 24919 51.8 50 1.5 759 75.8 41 39 53.2 1516 2536 17791 17811 50 42.9 5036 18229 18209 50.1 42.9 0.1 439 74.9 40.3 39 52.5 1517 2537 17791 17811
50 42.9 5037 18231 18211 50.6 47.6 0.6 441 75 40.6 39 52.6 1518 2538 24174 24194 50.9 42.9 5038 24740 24717 52.5 41.7 1.5 567 76 42.2 39 53.6 1519 2539
24174 24194 50.9 42.9 5039 24933 24913 51.1 42.9 0.2 760 75.8 40.9 39 53.4 1520 2540 17791 17811 50 42.9 5040 18234 18216 51 52.6 1 444 75.1 40.8 39 52.7
1521 2541 17791 17811 50 42.9 5041 18238 18219 50.3 45 0.2 448 75.1 40.8 39 52.7 1522 2542 17791 17811 50 42.9 5042 18239 18220 50 45 0 449 75.1 40.8 39
52.7 1523 2543 24035 24053 52.2 52.6 5043 24526 24506 50.3 42.9 1.9 492 75.4 41.3 39 53 1524 2544 24035 24053 52.2 52.6 5044 24527 24507 51 42.9 1.2 493
75.4 41.2 39 53.2 1525 2545 17607 17628 52.3 40.9 5045 18231 18209 53.5 47.8 1.2 625 75.2 40 39 53.4 1526 2546 29196 29216 52.5 47.6 5046 29358 29339
52.8 50 0.3 163 74.9 46.6 39 53.3 1527 2547 17608 17628 50.9 42.9 5047 18231 18211 50.6 47.6 0.4 624 75.2 40.1 39 52.9 1528 2548 8868 8889 50.4 50 0.4 5048
9248 9229 50.1 45 0.3 381 75 41.2 39 52.7 1529 2549 17608 17628 50.9 42.9 5049 18234 18216 51 52.6 0 627 75.3 40.2 39 53.1

1530 2550 29196 29215 51.8 50 5050 29358 29339 52.8 50 1 163 74.9 46.6 39 53.1 1531 2551 24023 24044 51.4 40.9 5051 24527 24508 50.5 45 0.9 505 75.4 41
39 53 1532 2552 9409 9428 51.6 45 5052 9989 9968 51 40.9 0.6 581 75.3 40.4 39 53.1 1533 2553 29196 29214 51.1 52.6 5053 29358 29339 52.8 50 1.7 163 74.9
46.6 39 52.8 1534 2554 8861 8880 50.2 45 5054 9257 9238 50.5 45 0.3 397 74.9 40.8 39 52.6 1535 2555 17607 17627 51.6 42.9 5055 18231 18209 53.5 47.8 1.9
625 75.2 40 39 53.2 1536 2556 29195 29213 51.9 52.6 5056 29358 29339 52.8 50 0.9 164 74.8 46.3 39 53 1537 2557 17608 17627 50.2 45 5057 18231 18211 50.6
47.6 0.4 624 75.2 40.1 39 52.8 1538 2558 985 1004 51.1 50 5058 1622 1602 51.6 47.6 0.5 638 77.2 44.7 39 54.4 1539 2559 17608 17627 50.2 45 5059 18234
18216 51 52.6 0.8 627 75.3 40.2 39 52.9 1540 2560 23841 23860 52.1 55 5060 24496 24478 50.7 52.6 1.4 656 76.1 42.1 39 53.6 1541 2561 23841 23860 52.1 55
5061 24498 24479 51.2 50 0.9 658 76.1 42.1 39 53.8 1542 2562 3404 3422 50.5 47.4 5062 3647 3628 50.6 45 0.1 244 74.6 42.6 39 52.5 1543 2563 9349 9367 51.7
52.6 5063 10017 9999 52.8 52.6 1.1 669 75.7 41 39 53.6 1544 2564 23841 23859 50.5 52.6 5064 24496 24478 50.7 52.6 0.2 656 76.1 42.1 39 53.5 1545 2565
25068 25085 50.3 50 5065 25548 25531 51.1 50 0.8 481 75.8 42.2 39 53.3 1546 2566 29186 29205 50.1 40 5066 29414 29395 50.5 50 0.4 229 75.4 45 39 52.9
1547 2567 29182 29204 53.2 43.5 5067 29358 29339 52.8 50 0.4 177 74.6 45.2 39 53.2 1548 2568 23841 23859 50.5 52.6 5068 24498 24479 51.2 50 0.7 658 76.1
42.1 39 53.5 1549 2569 3404 3422 50.5 47.4 5069 3646 3625 52 40.9 1.5 243 74.5 42.4 39 52.4 1550 2570 29183 29204 50.4 40.9 5070 29414 29395 50.5 50 0.2
232 75.4 44.8 39 53 1551 2571 23841 23859 50.5 52.6 5071 24527 24508 50.5 45 0 687 76.1 41.9 39 53.5 1552 2572 23838 23857 50.4 50 5072 24093 24075 50.9
52.6 0.5 256 75.8 45.3 39 53.3 1553 2573 23838 23857 50.4 50 5073 24496 24478 50.7 52.6 0.3 659 76.1 41.9 39 53.4 1554 2574 23838 23857 50.4 50 5074 24498
24479 51.2 50 0.8 661 76.1 41.3 39 53.5 1555 2575 29181 29201 52.4 47.6 5075 29358 29339 52.8 50 0.4 178 74.8 45.5 39 53.2 1556 2576 29181 29201 52.4 47.6
5076 29414 29395 50.5 50 1.9 234 75.6 45.3 39 53.2 1557 2577 29180 29200 51.7 42.9 5077 29358 29339 52.8 50 1.2 179 74.7 45.3 39 52.9 1558 2578 985 1004
51.1 50 5078 1498 1481 51 50 0.1 514 76.5 43.8 39 54 1559 2579 985 1004 51.1 50 5079 1497 1480 50.3 50 0.8 513 76.6 43.9 39 53.8 1560 2580 8859 8879 50
42.9 5080 9254 9236 50.6 47.4 0.6 396 75 40.9 39 52.6 1561 2581 29178 29198 51.4 42.9 5081 29414 29395 50.5 50 0.9 237 75.6 41.3 39 53.2 1562 2582 8859
8879 50 42.9 5082 9340 9319 50.8 45.5 0.7 482 75.5 41.5 39 53 1563 2583 16909 16928 50.8 45 5083 17109 17089 50.4 42.9 0.4 201 74.9 44.8 39 52.7 1564 2584
8794 8813 51.6 45 5084 8919 8901 50.4 47.4 1.2 126 71.8 42.1 39 50.5 1565 2585 8794 8813 51.6 45 5085 8920 8902 52.8 52.6 1.2 127 72 42.5 39 51 1566 2586
985 1004 51.1 50 5086 1496 1478 50.4 47.4 0.7 512 76.5 43.8 39 53.8 1567 2587 18017 18036 54.8 55 5087 18223 18205 53.3 52.6 1.5 207 74.3 43 39 53.1 1568
2588 4593 4613 51.5 47.6 5088 4994 4974 51.2 47.6 0.3 402 76.1 43.5 39 53.7 1569 2589 18017 18036 54.8 55 5089 18220 18201 56.1 55 1.3 204 74.3 43.1 39
53.5 1570 2590 6155 6174 53.2 50 5090 6486 6467 50.8 45 1.2 332 74.5 40.7 39 52.5 1571 2591 6158 6178 51.3 42.9 5091 6486 6467 50.8 45 0.4 329 74.3 40.1 39
52.4 1572 2592 3232 3251 50.3 50 5092 350

6463 50.2 42.9 0.1 210 73.5 41 39 51.6 1584 2604 18074 18093 50.3 45 5104 18223 18206 51.8 50 1.5 150 73.2 43.3 39 51.4 1585 2605 5 23 51.3 52.6 5105 314
296 50.6 47.4 0.6 310 76.8 46.5 39 54 1586 2606 6343 6364 50.7 45.5 5106 6486 6467 50.8 45 0.1 144 71.7 40.3 39 50.5 1587 2607 3800 3820 50.6 42.9 5107
4445 4425 50.6 42.9 0.6 310 76.8 46.5 39 54 1588 2608 7615 7635 51.1 47.6 5108 7821 7798 52.8 41.7 1.6 207 73.7 41.5 39 52 1589 2609 7723 7741 52.2 52.6 5109
8049 8032 50.4 50 1.8 327 74.9 41.6 39 52.6 1590 2610 1 19 50.1 52.6 5110 314 296 50.6 47.4 0.6 314 76.8 46.5 39 53.9 1591 2611 7725 7742 50 50 5111 7856
7836 51.1 42.9 1.1 132 71.3 40.2 2 39 50 1592 2612 18074 18094 51.1 42.9 5112 18233 18215 51.3 52.6 0.3 160 73.9 44.4 39 52.1 1593 2613 3168 3189 51 45.5
5113 3503 3484 51.5 50 0.5 336 75.3 42.6 39 53.1 1594 2614 18074 18094 51.1 42.9 5114 18231 18210 52.2 45.5 1.1 158 73.5 43.7 39 51.9 1595 2615 13177
13197 50.3 42.9 5115 13312 13294 51 52.6 0.7 136 72.7 43.4 39 51.1 1596 2616 28190 28209 54.2 55 5116 28671 28652 52.8 55 1.5 482 79.9 52.1 39 56.8 1597
2617 28190 28209 54.2 55 5117 28673 28654 53.5 55 0.7 484 79.9 52.3 39 57.1 1598 2618 28190 28208 51.7 52.6 5118 28671 28652 52.8 55 1.5 482 79.9 52.1 39
56.5 1599 2619 28190 28208 51.7 52.6 5119 28671 28653 50.2 52.6 1.5 482 79.9 52.1 39 56.1 1600 2620 18074 18094 51.1 42.9 5120 28213 18206 51 50 0.7
150 73.2 43.3 39 51.6 1601 2621 28185 28205 53.5 47.6 5121 28284 28265 52.9 50 0.6 100 74.5 52 39 53.1 1602 2622 28187 28205 53.1 52.6 5122 28672 28653
51.8 55 1.2 486 79.9 52.3 39 56.6 1603 2623 2371 2389 50.3 47.4 5123 2900 2881 50.1 45 0.2 530 76.8 44.3 39 53.9 1604 2624 2371 2389 50.3 47.4 5124 3052
3033 50.3 50 0.1 682 76.7 43.4 39 53.9 1605 2625 2371 2389 50.3 47.4 5125 3056 3038 50.8 52.6 0.5 686 76.7 43.4 39 53.9 1606 2626 18074 18094 52.5 45.5
5126 18223 18205 53.3 52.6 1.1 150 73.2 43.3 39 52 1607 2627 2220 2239 51.3 45 5127 2891 2873 50.8 47.4 0.5 672 76.8 43.8 39 54.1 1608 2628 18077 18097
51.5 47.6 5128 18662 18641 50.4 40.9 1.1 586 76.2 42.7 39 53.6 1609 2629 28117 28135 50.6 52.6 5129 28671 28653 50.2 52.6 0.4 555 80 51.9 39 56.1 1610 2630
28116 28134 50.8 47.4 5130 28671 28653 50.2 52.6 0.6 556 79.9 51.8 39 56.1 1611 2631 12232 12250 51.9 52.6 5131 13000 12981 51.1 45 0.8 769 76.5 42.5 39 54
1612 2632 18080 18098 51.2 52.6 5132 18702 18685 50.2 50 1 623 76.2 42.4 39 53.5 1613 2633 12232 12250 51.9 52.6 5133 12999 12980 50.6 40 1.4 768 76.4
42.4 39 53.8 1614 2634 28820 28840 54.8 47.6 5134 29306 29285 56.7 54.5 1.9 487 77.1 45.4 39 55.5 1615 2635 28820 28840 54.8 47.6 5135 29306 29287 54.6
55 0.3 487 77.1 45.4 39 55.5 1616 2636 18080 18098 51.2 52.6 5136 18642 18622 50.5 42.9 0.7 563 76.2 42.6 39 53.6 1617 2637 8865 8884 50.4 45 5137 9249
9231 50.8 47.4 0.4 385 75.1 41.3 39 52.8 1618 2638 8865 8884 50.4 45 5138 9249 9230 51.5 45 1.1 385 75.1 41.3 39 52.8 1619 2639 8865 8884 50.4 45 5139 9109
9087 50.5 43.5 0.1 245 73.9 40.8 39 51.9 1620 2640 28819 28839 56.6 52.4 5140 29306 29285 56.7 54.5 0.2 488 77.2 45.5 39 56.1 1621 2641 9130 9151 52 40.9
5141 9364 9346 53.9 52.6 2 235 74.8 43.3 39 53.1 1622 2642 28820 28839 54.3 50 5142 29306 29287 54.6 55 0.3 487 77.1 45.4 39 55.4 1623 2643 8865 8884 50.4
45 5143 9248 9229 50.1 45 0.3 384 75 41.1 39 52.7 1624 2644 18080 18098 51.2 52.6 5144 18229 18209 50.1 42.9 1.1 150 73.2 43.3 39 51.4 1625 2645 15752
15772 50.8 47.6 5145 16175 16155 51.8 47.6 1 424 75.1 41 39 52.9 1626 2646 12232 12250 51.9 52.6 5146 12498 12480 50 47.4 1.9 267 74.7 42.3 39 52.4 1627
2647 18078 18098 51.5 47.6 5147 18223 18205 53.3 52.6 1.8 146 73 43.3 39 51.6 1628 2648 7833 7853 50.7 47.6 5148 8054 8035 50 4 50 0.2 222 74.6 43.2 39
52.4 1629 2649 230 248 51.2 52.6 5149 713 695 50.7 47.4 0.5 484 73 50.6 39 55.8 1630 2650 1472 1491 51.2 45 5150 2153 2134 50.4 45 0.8 682 76.5 42.8 39
53.7 1631 2651 18076 18098 54.4 47.8 5151 18220 18201 56.1 55 1.8 145 73.1 43.4 39 52.6 1632 2652 1442 1461 51.6 55 5152 1694 1673 51.7 40.9 0.1 253 75.9
45.5 39 53.7 1633 2653 28618 28636 52.5 52.6 5153 29358 29339 52.8 50 0.3 741 78.2 47 39 55.6 1634 2654 940 959 56.3 55 5154 1701 1677 54.7 40 1.6 762
77.1 44.2 40 55.5 1635 2655 18076 18097 53.1 45.5 5155 18696 18672 53.9 40 0.8 621 76.2 42.4 40 54.4 1636 2656 940 959 56.3 55 5156 1697 1673 54.4 40 1.9
758 77.2 44.3 40 55.5 1637 2657 3016 3036 50.2 42.9 5157 3188 3167 50.2 40.9 0.1 173 74.5 45.1 40 52.3 1638 2658 18077 18097 51.5 47.6 5158 18696 18673
53.4 41.7 1.9 620 76.2 42.4 40 53.9 1639 2659 18077 18097 51.5 47.6 5159 18697 18679 51.9 52.6 0.3 621 76.2 42.5 40 53.9 1640 2660 9352 9371 50.6 45 5160
9989 9968 51 40.9 0.4 638 75.4 40.3 40 53 1641 2661 6042 6062 50.4 47.6 5161 6374 6353 50 40.9 0.3 333 74.6 40.8 40 52.3 1642 2662 942 960 52.1 52.6 5162
1697 1678 50.3 45 1.8 756 77.2 44.3 40 54.2 1643 2663 942 960 52.1 52.6 5163 1697 1677 51 42.9 1.1 756 77.2 44.3 40 54.4 1644 2664 6042 6062 50.4 47.6 5164
6292 6273 50.8 45 0.4 251 73.9 40.6 40 51.9 1645 2665 942 960 52.1 52.6 5165 1697 1676 51.7 40.9 0.5 756 77.2 44.3 40 54.6 1646 2666 942 960 52.1 52.6 5166
1694 1673 51.7 40.9 0.4 753 77.2 44.4 40 54.7 1647 2667 13176 13196 51.4 47.6 5167 13749 13727 50.5 43.5 0.9 574 76.2 42.7 40 53.6 1648 2668 13176 13196
51.4 47.6 5168 13949 13932 51.6 50 0.2 774 75.9 41.1 40 53.6 1649 2669 942 960 52.1 52.6 5169 1493 1473 52 47.6 0.1 552 76.9 44.4 40 54.5 1650 2670 6042
6062 50.4 47.6 5170 6292 6272 51.5 42.9 1.1 251 73.9 40.6 40 51.9 1651 2671 6042 6062 50.4 47.6 5171 6290 6270 50.9 42.9 0.6 249 73.8 40.6 40 51.9 1652 2672
6042 6062 50.4 47.6 5172 6289 6267 52.2 43.5 1.8 248 73.9 40.7 40 51.9 1653 2673 9402 9420 51.3 47.4 5173 10017 9999 52.8 52.6 1.4 616 75.6 41.1 40 53.5
1654 2674 943 961 50.3 47.4 5174 1697 1678 50.3 45 0.755 77.1 44.2 40 54.2 1655 2675 9139 9159 52.5 47.6 5175 9324 9300 52.9 40 0.4 186 73.9 43 40 52.6
1656 2676 9139 9159 52.5 47.6 5176 9324 9301 52.4 41.7 0.1 186 73.9 43 40 52.6

1657 2677 943 961 50.3 47.4 5177 1697 1677 51 42.9 0.7 755 77.1 44.2 40 54.2 1658 2678 6222 6246 52.2 40 5178 6486 6467 50.8 45 1.4 265 73.8 40 40 52 1659
2679 3895 3914 50.3 45 5179 4608 4590 51.5 52.6 1.2 714 75.5 40.3 40 53 1660 2680 3889 3911 54.2 47.8 5180 4610 4590 53.2 52.4 1.1 722 75.5 40.4 40 53.9
1661 2681 3889 3908 51.3 50 5181 4608 4590 51.5 52.6 0.3 720 75.5 40.4 40 53.4 1662 2682 9139 9159 52.5 47.6 5182 9359 9335 54.5 40 1.9 221 74.7 43.4 40
53.1 1663 2683 943 961 50.3 47.4 5183 1697 1676 51.7 40.9 1.4 755 77.1 44.2 40 54.2 1664 2684 943 961 50.3 47.4 5184 1694 1673 51.7 40.9 1.5 752 77.2 44.3
40 54.2 1665 2685 6302 6321 51.4 50 5185 6483 6463 50.2 42.9 1.2 182 72.9 40.7 40 51.2 1666 2686 9409 9428 51.6 45 5186 10017 9999 52.8 52.6 1.2 609 75.6
41.1 40 53.5 1667 2687 943 961 50.3 47.4 5187 1493 1473 52 47.6 1.7 551 76.8 44.3 40 54 1668 2688 13039 13058 51.8 50 5188 13312 13294 51 52.6 0.8 274
75.7 44.5 40 53.4 1669 2689 3799 3820 52.9 45.5 5189 4565 4542 53.9 41.7 1 767 75.5 40.2 40 53.8 1670 2690 985 1004 51.1 50 5190 1481 1463 50.5 47.4 0.6
497 76.4 43.5 40 53.7 1671 2691 13039 13058 51.8 50 5191 13325 13305 50.5 47.6 1.3 287 75.8 44.6 40 53.3 1672 2692 7615 7635 51.1 47.6 5192 8049 8032 50.4
50 0.8 435 75.7 42.3 40 53.2 1673 2693 7615 7635 51.1 47.6 5193 7853 7833 50.7 47.6 0.4 239 74.4 42.3 40 52.4 1674 2694 3034 3053 50.3 50 5194 3503 3484
51.5 50 1.2 470 76.3 43.4 40 53.6 1675 2695 9140 9159 50.1 45 5195 9334 9315 52.1 50 2 195 74.3 43.6 40 52.1 1676 2696 3799 3819 51.3 47.6 5196 4186 4168
51.8 52.6 0.5 388 75.3 41.8 40 53.2 1677 2697 3799 3819 51.3 47.6 5197 4434 4416 51.5 52.6 0.2 636 75.3 40.3 40 53.2 1678 2698 3799 3819 51.3 47.6 5198 4435
4417 50.5 52.6 0.8 637 75.4 40.3 40 53 1679 2699 7617 7636 50.9 50 5199 8190 8172 50.3 47.4 0.6 574 76.1 42.3 40 53.4 1680 2700 18011 18032 55.7 54.5 5200
18443 18424 55.9 55 0.2 433 76.1 43.2 40 55.1 1681 2701 18013 18032 52.2 55 5201 18696 18672 53.9 40 1.7 684 76.3 42.4 40 54.2 1682 2702 18013 18032 52.2
55 5202 18696 18673 53.4 41.7 1.2 684 76.3 42.4 40 54.2 1683 2703 13177 13197 50.3 42.9 5203 13545 13527 50.3 52.6 0 369 77 46.1 40 54.1 1684 2704 9922
9941 51.3 50 5204 10455 10434 51.1 40.9 0.1 534 75.3 40.6 40 53.1 1685 2705 7617 7636 50.9 50 5205 7853 7833 50.7 47.6 0.3 237 74.4 42.2 40 52.4 1686 2706
13177 13197 50.3 42.9 5206 13329 13308 50.5 40.9 0.2 153 73.2 43.1 40 51.4 1687 2707 18014 18032 51 52.6 5207 18238 18219 50.3 45 0.7 225 74.8 43.6 40
52.5 1688 2708 18014 18032 51 52.6 5208 18239 18220 50 45 0.9 226 74.7 43.4 40 52.4 1689 2709 18014 18032 51 52.6 5209 18697 18679 51.9 52.6 0.9 684 76.3
42.4 40 53.8 1690 2710 7708 7730 50.6 43.5 5210 7853 7833 50.7 47.6 0.1 146 71.8 40.4 40 50.6 1691 2711 9140 9159 50.1 45 5211 9358 9338 51 42.9 0.9 219
74.4 42.9 40 52.2 1692 2712 7723 7741 52.2 52.6 5212 7856 7836 51.1 42.9 1.1 134 71.4 40.3 40 50.4 1693 2713 988 1006 52.2 52.6 5213 1171 1153 50.4 47.4 1.8
184 73.8 42.9 40 51.9 1694 2714 13177 13197 50.3 42.9 5214 13328 13307 51.2 45.5 0.9 152 73.3 43.4 40 51.5 1695 2715 9935 9955 50.4 42.9 5215 10608 10589
51 50 0.6 674 75.8 41.1 40 53.2 1696 2716 985 1008 56 50 5216 1484 1463 55.5 50 0.5 500 76.4 43.6 40 55.3 1697 2717 13033 13051 52.1 52.6 5217 13179
13158 50.4 40.9 1.7 147 74.3 46.3 40 52.2 1698 2718 12977 12996 50.2 40 5218 13320 13300 51.4 47.6 1.1 344 76.1 44.2 40 53.4 1699 2719 12977 12996 50.2 40
5219 13321 13301 50.3 42.9 0.1 345 76 44.1 40 53.4 1700 2720 2823 2844 50.4 45.5 5220 3192 3171 51.9 50 1.5 370 75.7 43 40 53.2 1701 2721 18009 18030 54.6
54.5 5221 18443 18424 55.9 55 1.4 435 76.1 43.2 40 54.7 1702 2722 12976 12995 51.1 45 5222 13320 13300 51.4 47.6 0.3 345 76.1 44.3 40 53.7 1703 2723 1046
1064 51.2 47.4 5223 1531 1512 52.7 55 1.5 486 76.7 44.2 40 54.1 1704 2724 12976 12995 51.1 45 5224 13321 13301 50.3 42.9 0.8 346 76.1 44.2 40 53.5 1705
2725 12976 12994 50.3 47.4 5225 13320 13300 51.4 47.6 1.1 345 76.1 44.3 40 53.5 1706 2726 12976 12994 50.3 47.4 5226 13321 13301 50.3 42.9 0 346 76.1 44.2
40 53.5 1707 2727 18011 18030 52.9 55 5227 18696 18672 53.9 40 1 686 76.3 42.4 40 54.4 1708 2728 18011 18030 52.9 55 5228 18696 18673 53.4 41.7 0.5 686
76.3 42.4 40 54.4 1709 2729 18011 18030 52.9 55 5229 18697 18679 51.9 52.6 1 687 76.3 42.5 40 54.1 1710 2730 9140 9159 50.1 45 5230 9374 9353 50.1 40.9 0
235 74.5 42.6 40 52.3 1711 2731 3 23 55.4 52.4 5231 204 185 56.6 55 1.3 202 75 45 40 54.2 1712 2732 15255 15273 50.3 52.6 5232 15761 15741 51.7 47.6 1.4
507 75 40 40 52.7 1713 2733 15255 15273 50.3 52.6 5233 15763 15743 52 47.6 1.7 509 75 40.1 40 52.7 1714 2734 12965 12985 51.2 42.9 5234 13320 13300 51.4
47.6 0.2 356 76.1 44.1 40 53.7 1715 2735 8373 8391 50.7 47.4 5235 9060 9039 50.3 40.9 0.4 688 75.4 40.1 40 53 1716 2736 12962 12980 50.7 47.4 5236 13320
13300 51.4 47.6 0.7 359 76.2 44.3 40 53.6 1717 2737 12938 12957 50.9 45 5237 13155 13137 52.1 52.6 1.2 218 75.4 45.4 40 53.2 1718 2738 2671 2692 52.1 40.9
5238 3190 3169 50.7 45.5 1.5 520 75.6 41.5 40 53.2 1719 2739 2671 2692 52.1 40.9 5239 3192 3171 51.9 50 0.2 522 75.7 41.8 40 53.7 1720 2740 12938 12956
50.1 47.4 5240 13155 13137 52.1 52.6 2 218 75.4 45.4 40 52.9 1721 2741 26421 26441 51.5 42.9 5241 26592 26574 52.4 52.6 0.9 172 72.4 40.1 40 51.2 1722 2742
18006 18028 54.5 52.2 5242 18443 18424 55.9 55 1.4 438 76.1 43.2 40 54.7 1723 2743 26421 26441 51.5 42.9 5243 26656 26635 52.9 45.5 1.4 236 74.2 41.9 40
52.5 1724 2744 3055 3074 51.1 50 5244 3210 3190 50.5 47.6 0.6 156 74.2 45.5 40 52.2 1725 2745 7833 7853 50.7 47.6 5245 8189 8170 50.6 50 0 357 75.6 42.9 40
53.2 1726 2746 26421 26441 51.5 42.9 5246 26658 26640 50.8 47.4 0.7 238 74.1 41.6 40 52.2 1727 2747 9131 9151 50.4 42.9 5247 9328 9310 51 52.6 0.7 198
74.3 43.4 40 52.2 1728 2748 24921 24938 50.4 50 5248 25650 25631 51.3 45 0.9 730 75.5 40.4 40 53.1 1729 2749 24921 24938 50.4 50 5249 25651 25634 50.4 50
0 731 75.6 40.5 40 53.1 1730 2750 9130 9151 52 40.9 5250 9324 9301 52.4 41.7 0.5 195 73.9 42.6 40 52.4 1731 2751 9130 9151 52 40.9 5251 9324 9300 52.9 40 1
195 73.9 42.6 40 52.4 1732 2752 8376 8396 50.6 42.9 5252 9107 9086 51.6 45.5 1 732 75.4 40 40 53.1 1733 2753 11541 11561 50.9 42.9 5253 11727 11708 50.4
45 0.5 187 73 40.6 40 51.3 1734 2754 11540 11561 53.8 45.5 5254 11984 11966 53 52.6 0.7 445 75.1 40.7 40 53.6 1735 2755 2371 2389 50.3 47.4 5255 2672 2654
50.9 52.6 0.5 302 77.1 47.4 40 54.2

40 53.7 1747 2767 12233 12251 51.1 52.6 5267 12412 12392 50 42.9 1.1 180 73.2 41.7 40 51.4 1748 2768 24562 24580 50.1 52.6 5268 25086 25069 50.3 50 0.2 525 75.4 41 40 52.9 1749 2769 9931 9950 50.2 45 5269 10608 10589 51 50 0.8 678 75.8 41.2 40 53.2 1750 2770 24562 24580 50.1 52.6 5270 25209 25189 51.4 47.6 1.3 648 76.1 42 40 53.4 1752 2772 3789 3807 51.8 52.6 5272 4445 4425 50.6 42.9 1.2 657 75.5 40.5 40 53.1 1753 2773 26039 26058 54 55 5273 26656 26634 53.4 43.5 0.6 618 75.5 40.6 40 53.9 1754 2774 26039 26058 54 55 5274 26660 26639 52.5 45.5 1.5 622 75.4 40.5 40 53.7 1755 2775 3789 3807 51.8 52.6 5275 4444 4424 50.6 42.9 1.2 656 75.5 40.5 40 53.1 1756 2776 24559 24579 52 52.4 5276 25086 25069 50.3 50 1.6 528 75.5 41.1 40 53 1757 2777 12235 12253 50.1 52.6 5277 12999 12980 50.6 40 0.5 765 76.4 42.5 40 53.6 1758 2778 24559 24579 52 52.4 5278 25209 25188 52 45.5 0 651 76.1 42.1 40 54 1759 2779 24559 24579 52 52.4 5279 25209 25189 51.4 47.6 0.6 651 76.1 42.1 40 53.8 1760 2780 887 905 50.1 47.4 5280 1499 1482 50.1 50 0.1 613 77.1 44.7 40 54.1 1761 2781 24558 24577 50 52 52.1 25182 25164 51.4 47.4 0.7 625 76 41.9 40 53.5 1762 2782 26039 26058 54 55 5282 26828 26810 51.9 52.6 1.2 790 76.4 42.4 40 54.5 1763 2783 8866 8885 51.1 45 5283 9597 9577 50.3 42.9 0.8 732 75.8 41.1 40 53.3 1764 2784 7727 7745 50.8 47.4 5284 8049 8032 50.4 50 0.5 323 74.8 41.5 40 52.6 1765 2785 13177 13197 50.3 42.9 5285 13747 13726 50.8 40.9 0.4 571 76.2 42.6 40 53.5 1766 2786 887 905 50.1 47.4 5286 1498 1481 51 50 0.9 612 77.2 44.8 40 54.1 1767 2787 1784 1803 52.5 50 5287 2103 2083 50.6 42.9 2 320 76 44.4 40 53.5 1768 2788 12235 12253 50.1 52.6 5288 12498 12480 50 47.4 0.1 264 74.7 42.4 40 52.4 1769 2789 1784 1802 51.8 52.6 5289 2103 2083 50.6 42.9 1.3 320 76 44.4 40 53.5 1770 2790 887 905 50.1 47.4 5290 1496 1478 50.4 47.4 0.3 610 77.1 44.8 40 54.1 1771 2791 1783 1801 52.9 52.6 5291 2153 2133 52.1 42.9 0.9 371 76 43.7 40 53.9 1772 2792 887 905 50.1 47.4 5292 1494 1476 50.7 47.4 0.6 608 77.1 44.7 40 54.1 1773 2793 3791 3809 51.8 52.6 5293 4445 4425 50.6 42.9 1.2 655 75.5 40.5 40 53.1 1774 2794 17813 17832 50.1 45 5294 18506 18488 51.2 52.6 1.2 694 75.8 41.2 40 53.2 1775 2795 3791 3809 51.8 52.6 5295 4444 4424 50.6 42.9 1.2 654 75.5 40.5 40 53.1 1776 2796 17840 17859 50.8 45 5296 18233 18215 51.3 52.6 0.5 394 74.9 40.9 40 52.8 1777 2797 17840 17859 50.8 45 5297 18233 18214 52 50 1.3 394 74.9 40.9 40 52.8 1778 2798 9930 9949 52.2 50 5298 10356 10336 52.4 47.6 0.2 427 75.6 42.2 40 53.7 1779 2799 15211 15230 50.2 45 5299 15949 15930 51.1 45 0.9 739 75.5 40.3 40 53 1780 2800 98 118 50.6 42.9 5300 253 233 51.8 47.6 1.2 156 74.5 46.2 40 52.4 1781 2801 18004 18023 51.1 50 5301 18233 18214 52 50 0.9 230 75 43.9 40 52.9 1782 2802 24420 24440 50.8 42.9 5302 24936 24919 51.8 50 1 517 75.9 42.2 40 53.5 1783 2803 24420 24440 50.8 42.9 5303 24938 24921 50.4 50 0.4 519 75.8 42

40 53.3 1784 2804 98 118 50.6 42.9 5304 254 235 50 45 0.6 157 74.4 45.9 40 52.2 1785 2805 11540 11557 50.4 50 5305 11727 11707 51.1 42.9 0.7 188 73.1 41 40 51.4 1786 2806 98 118 50.6 42.9 5306 642 622 51.6 47.6 0.9 545 79.1 49.7 40 55.6 1787 2807 15211 15230 50.2 45 5307 15595 15576 50.8 45 0.6 385 75.1 41.3 40 52.7 1788 2808 15255 15270 50.3 52.6 5308 15767 15747 50 42.9 0.3 513 75.1 40.2 40 52.6 1789 2809 12373 12391 50.8 47.4 5309 12911 12891 51.2 47.6 0.4 539 76.1 42.5 40 53.6 1790 2810 18009 18028 51.6 55 5310 18697 18679 51.9 52.6 0.2 689 76.4 42.5 40 54 1791 2811 18009 18028 51.6 55 5311 18696 18673 53.4 41.7 1.8 688 76.3 42.4 40 54 1792 2812 18009 18028 51.6 55 5312 18239 18220 50 45 1.6 231 74.9 43.7 40 52.5 1793 2813 18009 18028 51.6 55 5313 18238 18219 50.3 45 1.4 230 75 43.9 40 52.7 1794 2814 24417 24436 52.6 50 5314 25079 25061 52.7 52.6 0.1 663 75.8 41.3 40 54 1795 2815 10250 10271 50.6 45 5315 10356 10336 52.4 47.6 1.8 107 70.8 42.1 40 49.9 1796 2816 1356 1375 53.5 53 1684 1464 54.3 47.6 0.5 129 74.4 48.1 40 53.3 1797 2817 1356 1375 53.8 55 5317 1484 1465 53.8 50 0 129 74.4 48.1 40 53.3 1798 2818 1356 1375 53.8 55 5318 1484 1466 53.1 52.6 0.7 129 74.4 48.1 40 53.1 1799 2819 24418 24436 50 47.4 5319 24560 24542 50.2 47.4 0.1 143 72.4 42 40 50.8 1800 2820 18008 18028 53 52.4 5320 18696 18672 53.9 40 0.9 689 76.3 42.4 40 54.4 1801 2821 25363 25381 51.1 52.6 5321 25646 25627 50.5 45 0.7 284 74.1 40.5 40 52.1 1802 2822 9131 9151 50.4 42.9 5322 9333 9315 52.2 52.6 1.9 203 74.6 43.8 40 52.4 1803 2823 9131 9151 50.4 42.9 5323 9374 9353 50.1 40.9 0.3 244 74.6 42.6 40 52.4 1804 2824 24380 24399 55 55 5324 24582 24560 54.2 52.2 0.9 203 74.4 43.3 40 53.4 1805 2825 19802 19820 53 52.6 5325 19921 19900 51.8 45.5 1.2 120 72.4 44.2 40 51.3 1806 2826 3055 3075 51.8 47.6 5326 3210 3190 50.5 47.6 1.3 156 74.2 45.5 40 52.2 1807 2827 3055 3075 51.8 47.6 5327 3207 3187 50.5 47.6 1.3 153 74 45.1 40 52 1808 2828 3055 3076 52.4 45.5 5328 3210 3190 50.5 47.6 2 156 74.2 45.5 40 52.2 1809 2829 24379 24398 55 55 5329 24582 24560 54.2 52.2 0.9 204 74.3 43.1 40 53.3 1810 2830 7876 7895 51.5 45 5330 8054 8035 50.4 50 1.1 179 73.5 42.5 40 51.7 1811 2831 3055 3076 52.4 45.5 5331 3207 3187 50.5 47.6 2 153 74 45.1 40 52 1812 2832 9130 9150 51.3 42.9 5332 9324 9300 52.9 40 1.6 195 73.9 42.6 40 52.2 1813 2833 9130 9150 51.3 42.9 5333 9324 9301 52.4 41.7 1.1 195 73.9 42.6 40 52.2 1814 2834 8794 8813 51.6 45 5334 9324 9301 52.4 41.7 0.8 531 75.7 41.6 40 53.6 1815 2835 8794 8813 51.6 45 5335 9324 9300 52.9 40 1.3 531 75.7 41.6 40 53.6 1816 2836 9130 9150 51.3 42.9 5336 9328 9310 51 52.6 0.3 199 74.2 43.2 40 52.4 1817 2837 9130 9150 51.3 42.9 5337 9333 9315 52.2 52.6 0.9 204 74.5 43.6 40 52.6 1818 2838 24179 24200 53.3 40.9 5338 24807 24786 51.7 45.5 1.6 629 75.8 41.3 40 53.7 1819 2839 4593 4613 51.5 47.6 5339 4708 4690 50.3 47.4 1.3 116 71.4 42.2 40 50.2 1820 2840 9130 9150 51.3 42.9 5340 9374 9353 50.1 40.9 1.2 245 74.6 42.4 40 52.3 1821 2841 29180 29199 50.1 40 5341 29412 29393 50.3 45 0.2 233 75.5 45.1 40 53 1822 2842 25348 25366 51.2 47.4 5342 25772 25753 51.9 50 0.8 425 74.9 40.5 40 52.9 1823 2843 24179 24200 53.3 40.9 5343 24815 24792 53.4 41.7 0.2 637 75.8 41.3 40 54.1 1824 2844 8794 8813 51.6 45 5344 9101 9081 50.5 47.6 1.2 308 74.8 41.6 40 52.6 1825 2845 16861 16880 50.8 50 5345 17056 17035 51.8 45.5 1 196 74.7 44.4 40 52.6 1826 2846 16562 16581 52.6 50 5346 17038 17021 50.7 50 1.9 477 75.7 41.9 40 53.3 1827 2847 16562 16581 52.6 50 5347 17039 17022 51.4 50 1.2 478 75.6 41.8 40 53.5 1828 2848 16562 16581 52.6 50 5348 17041 17023 53.5 52.6 0.9 480 75.7 41.9 40 53.8 1829 2849 3090 3110 50.3 42.9 5349 3647 3628 50.6 45 0.3 558 76.2 42.7 40 53.5 1830 2850 16562 16580 51.9 52.6 5350 17038 17021 50.7 50 1.2 477 75.7 41.9 40 53.3 1831 2851 16562 16580 51.9 52.6 5351 17039 17022 51.4 50 0.5 478 75.6 41.8 40 53.5 1832 2852 24178 24198 52.7 42.9 5352 24815 24792 53.4 41.7 0.7 638 75.7 41.2 40 53.9 1833 2853 16562 16580 51.9 52.6 5353 17041 17023 53.5 52.6 1.6 480 75.7 41.9 40 53.6 1834 2854 24179 24198 51 45 5354 24807 24786 51.7 45.5 0.7 629 75.8 41.3 40 53.5 1835 2855 24179 24198 51 45 5355 24818 24797 51.6 40.9 0.6 640 75.8 41.2 40 53.4 1836 2856 3090 3110 50.3 42.9 5356 3646 3625 52 40.9 1 577 76.1 42.5 40 53.5 1837 2857 3089 3110 51.8 45.5 5357 3650 3631 53.1 50 1.3 562 76.3 42.9 40 54 1838 2858 29259 29279 54 52.4 5358 29358 29339 52.8 50 1.1 100 72.4 47 40 51.6 1839 2859 8794 8813 51.6 45 5359 8928 8911 51.9 50 0.2 135 72.2 42.2 40 51.1 1840 2860 24176 24197 52.1 40.9 5360 24815 24792 53.4 41.7 1.3 640 75.8 41.2 40 53.8 1841 2861 29259 29277 50.9 52.6 5361 29358 29339 52.8 50 2 100 72.4 47 40 51.1 1842 2862 29257 29276 51.3 50 5362 29358 29339 52.8 50 1.5 102 72.6 47.1 40 51.3 1843 2863 9915 9935 51.8 47.6 5363 10017 9999 52.8 52.6 1 103 72.9 47.6 40 51.6 1844 2864 4639 4659 51.1 47.6 5364 5306 5288 52.4 52.6 1.3 668 75.6 40.9 40 53.4 1845 2865 24178 24197 50.3 40 5365 24807 24786 51.7 45.5 1.4 630 75.8 41.3 40 53.2 1846 2866 28653 28671 50.2 52.6 5366 29414 29395 50.5 50 0.3 762 78 46.2 40 54.7 1847 2867 28653 28671 50.2 52.6 5367 29412 29393 50.3 45 0.1 760 78 46.2 40 54.7 1848 2868 28652 28671 52.8 55 5368 29358 29339 52.8 50 0 707 78 46.4 40 55.5 1849 2869 15752 15772 50.8 47.6 5369 16213 16195 50.8 52.6 0 462 75.4 41.3 40 53.1 1850 2870 24178 24197 50.3 40 5370 24818 24797 51.6 40.9 1.4 641 75.7 41.2 40 53.2 1851 2871 19794 19814 51.7 47.6 5371 19909 19885 52.5 40 8 116 71.8 43.1 40 50.8 1852 2872 8866 8885 51.1 45 5372 9341 9322 51.1 50 0 476 75.6 41.8 40 53.4 1853 2873 15951 15973 52.1 43.5 5373 16175 16155 51.8 47.6 0.3 225 73.7 40.9 40 52.2 1854 2874 24174 24195 52.5 40.9 5374 24815 24791 54.5 40 2 642 75.8 41.3 40 53.9 1855 2875 8866 8885 51.1 45 5375 9340 9319 50.8 45.5 0.3 475 75.6 41.7 40 53.2 1856 2876 15951 15973 52.1 43.5 5376 16169 16151 51.3 52.6 0.8 219 73.5 40.6 40 51.9 1857 2877 15951 15974 53.3 41.7 5377 16175 16154 53.4 45.5 0.1 225 73.7 40.9 40 52.7 1858 2878 27437 27456 50.2 40 5378 27541 27521 51.7 47.6 1.5 105 71.8 44.8 40 50.4 1859 2879 15650 15674 52.9 40 5379 16210 16192 54.3 52.6 1.4 561 75.1 40.1 40 53.6 1860 2880 8866 8885 51.1 45 5380 9334 9316 51.3 52.6 0.2 469 75.7 42 40 53.4 1861 2881 8866 8885 51.1 45 5381 9310 9291 51.2 45 0.1 445 75.3 41.3 40 53.2 1862 2882 8866 8885 51.1 45 5382 9252 9234 51.4 52.6 0.3 387 75.1 41.3 40 53 1863 2883 3360 3379 50.7 45 5383 3494 3473 50.4 40.9 0.3 135 73.7 45.9 40 51.8 1864 2884 8866 8885 51.1 45 5384 9248 9229 50.1 45 1 383 75.1 41.3 40 52.7 1865 2885 18081 18099 51.2 52.6 5385 18697 18679 51.9 52.6 0.7 617 76.3 42.6 40 53.9 1866 2886 8865 8884 50.4 45 5386 9257 9238 50.5 45 0.1 393 75 41 40 52.7 1867 2887 18081 18099 51.2 52.6 5387 18239 18220 50 42.1 0.2 159 74 44.7 40 51.9 1868 2888 18081 18099 51.2 52.6 5388 18238 18219 50.3 45 0.9 158 74.1 44.9 40 52 1869 2889 28117 28135 50.6 52.6 5389 28505 28487 50.2 47.4 0.4 389 79.5 51.9 40 55.8 1870 2890 8866 8885 51.1 45 5390 9109 9087 50.5 43.5 0.6 244 73.9 41 40 52 1871 2891 9055 9079 52.8 40 5391 9724 9706 51.3 52.6 1.5 670 75.4 40.3 40 53.3 1872 2892 3403 3423 54.1 47.6 5392 3502 3478 55.8 48 1.7 100 71.6 45 40 51.5 1873 2893 28855 28874 52.9 50 5393 29306 29288 53.5 52.6 0.6 452 77.1 45.6 40 54.9 1874 2894 24173 24194 52.5 40.9 5394 24815 24792 53.4 41.7 0.9 643 75.8 41.2 40 53.9 1875 2895 3094 3113 50 50 5395 3647 3628 50.6 45 0.6 554 76.2 42.8 40 53.5 1876 2896 24174 24194 50.9 42.9 5396 24807 24786 51.7 45.5 0.8 634 75.8 41.3 40 53.4 1877 2897 28856 28875 52.2 50 5397 29306 29288 53.5 52.6 1.3 451 77.1 45.7 40 54.7 1878 2898 24174 24194 50.9 42.9 5398 24818 24797 51.6 40.9 0.7 645 75.8 41.2 40 53.4 1879 2899 28857 28876 51.7 45 5399 29306 29288 53.5 52.6 1.8 450 77.1 45.6 40 54.6 1880 2900 8858 8877 51.2 45 5400 9254 9236 50.6 47.4 0.6 397 75 41.1 40 52.8 1881 2901 16553 16571 53.4 52.6 5401 16777 16758 51.5 50 1.9 225 73.7 40 40 52.1 1882 2902 29197 29219 54.8 47 5402 29301 29282 55.3 55 0.5 105 73.4 48.6 40 52.9 1883 2903 29198 29219 52.6 45.5 5403 29306 29288 53.5 52.6 0.9 109 73.3 47.7 40 52.2 1884 2904 28857 28877 52.3 42.9 5404 29306 29288 53.5 52.6 1.2 450 77.1 45.6 40 54.8 1885 2905 29199 29219 51.2 42.9 5405 29298 29280 51.4 52.6 0.2 100 72.4 47 40 51.1 1886 2906 3094 3113 50 50 5406 3646 3625 52 40.9 2 553 76.2 42.7 40 53.4 1887 2907 3224 3243 52.3 50 5407 3650 3631 53.1 50 0.8 427 75.5 41.9 40 53.7 1888 2908 29195 29216 53.8 45.5 5408 29306 29287 54.6 55 0.8 112 73.6 48.2 40 52.8 1889 2909 28867 28885 51.5 52.6 5409 29358 29339 52.8 50 1.4 492 76.9 44.9 40 54.4 1890 2910 29196 29216 52.5 47.6 5410 29298 29279 52.6 55 0.1 103 73.3 48.5 40 52.1 1891 2911 28867 28886 53.2 50 5411 29415 29395 53.4 52.4 0.2 549 77.1 45 40 55 1892 2912 3093 3113 51.7 47.6 5412 3650 3631 53.1 50 1.4 558 76.3 42.8 40 54 1893 2913 3225 3243 50.9 52.6 5413 3646 3625 52 40.9 1.2 422 75.4 41.7 40 53.1 1894 2914 3225 3243 50.9 52.6 5414 3647 3628 50.6 45 0.3 423 75.5 41.8 40 53.1 1895 2915 28867 28886 53.5 50 5415 29306 29287 54.6 55 1.4 440 76.9 45.2 40 54.9 1896 2916 3223 3241 50.2 52.6 5416 3500 3481 51.2 50 1.2 748 74.7 42.1 40 52.5 1897 2917 28867 28886 53.2 50 5417 29298 29279 52.6 55 0.5 432 76.8 45.1 40 54.7 1898 2918 24034 24053 53.4 55 5418 24815 24791 54.5 40 1.1 782 76.3 42.1 40 54.5 1899 2919 3221 3239 51.5 52.6 5419 3650 3631 53.1 50 1.6 430 75.5 41.9 40 53.4 1900 2920 18080 18099 53 50 5420 18696 18673 53.4 41.7 0.5 617 76.2 42.5 40 54.3 1901 2921 3095 3116 51.

73.3 48.5 40 51.9 1910 2930 3218 3237 50.5 45 5430 3500 3481 51.2 50 0.6 283 74.6 41.7 40

52.5 1911 2931 8867 8886 50.7 50 5431 9245 9226 50 45 0.6 379 75 41.2 40 52.6 1912 2932 28868 28888 51.4 42.9 5432 29298 29279 52.6 55 1.2 431 76.8 45 40
54.3 1913 2933 8867 8886 50.7 50 5433 9107 9086 51.6 45.5 0.9 241 74.1 41.5 40 52.2 1914 2934 28867 28888 54.3 45.5 5434 29306 29287 54.6 55 0.3 440 76.9
45.2 40 55.2 1915 2935 19906 19925 50.1 50 5435 20615 20597 50.6 47.4 0.5 710 75.5 40.3 40 53 1916 2936 16551 16568 51.1 50 5436 16775 16756 50.3 45 0.8
225 73.8 41.3 40 51.9 1917 2937 8861 8880 50.2 45 5437 9341 9322 51.1 50 0.9 481 75.5 41.6 40 53 1918 2938 16368 16387 50.2 45 5438 16781 16761 51.3 47.6
1 414 75 40.8 40 52.7 1919 2939 3055 3074 51.1 50 5439 3209 3189 50.5 47.6 0.6 155 74.1 45.2 40 52.1 1920 2940 3217 3236 51.1 50 5440 3650 3631 53.1 50 2
434 75.5 41.9 40 53.3 1921 2941 28868 28889 52 40.9 5441 29298 29297 52.6 55 0.6 431 76.8 45 40 54.5 1922 2942 28867 28889 54.8 43.5 5442 29306 29287
54.6 55 0.2 440 76.9 45.2 40 55.3 1923 2943 3404 3422 50.5 47.4 5443 3503 3484 51.5 50 0.9 100 71.6 45 40 50.4 1924 2944 16368 16387 50.2 45 5444 16777
16758 51.5 50 1.2 410 75 40.7 40 52.6 1925 2945 24029 24047 52.1 52.6 5445 24815 24792 53.4 41.7 1.3 787 76.3 42.1 40 54.1 1926 2946 16368 16387 50.2 45
5446 16711 16691 51 42.9 0.8 344 75.1 41.9 40 52.7 1927 2947 28867 28890 55.2 41 7 5447 29306 29287 54.6 55 0.6 440 76.9 45.2 40 55.3 1928 2948 29196
29214 51.1 52.6 5448 29298 29279 52.6 55 1.5 103 73.3 48.5 40 51.7 1929 2949 18488 18507 53.7 55 5449 19224 19200 52.4 40 1.3 737 76 41.5 40 54 1930 2950
28395 28413 50.2 42.1 5450 28506 28488 50.2 47.4 0 112 74.4 50 40 52.2 1931 2951 16551 16568 51.1 50 5451 17032 17011 52 45.5 0.9 482 75.8 42.1 40 53.5
1932 2952 28871 28891 50.9 42.9 5452 29358 29339 52.8 50 1.9 488 76.9 44.9 40 54.2 1933 2953 28871 28891 50.9 42.9 5453 29298 29280 51.4 52.6 0.5 428
76.8 45.1 40 54.2 1934 2954 28870 28891 52.2 40.9 5454 29306 29288 53.5 52.6 1.2 437 76.8 45.1 40 54.6 1935 2955 28868 28891 53.8 41.7 5455 29301 29282
55.3 55 1.5 434 76.9 45.2 40 55.1 1936 2956 3404 3422 50.5 47.4 5456 3504 3485 50.4 45 0.1 101 71.5 44.6 40 50.3 1937 2957 29195 29213 51.9 52.6 5457 29298
29279 52.6 55 0.7 104 73.1 48.1 40 51.9 1938 2958 28938 28956 50.8 47.4 5458 29298 29280 51.4 52.6 0.6 361 76.4 44.9 40 53.8 1939 2959 18488 18507 53.7 55
5459 19210 19191 52 50 1.7 723 76 41.6 40 53.9 1940 2960 3095 3116 51.9 45.5 5460 3647 3628 50.6 45 1.3 553 76.2 42.7 40 53.6 1941 2961 3214 3233 51.1 50
5461 3497 3478 51.3 50 0.2 284 74.7 41.9 40 52.7 1942 2962 24017 24039 53 43.5 5462 24815 24791 54.5 40 1.5 799 76.2 41.9 40 54.4 1943 2963 3095 3116 51.9
45.5 5463 3646 3625 52 40.9 0.1 552 76.1 42.6 40 54 1944 2964 18550 18571 50.4 40 5464 19215 19194 50.2 40.9 0.2 666 75.8 41.1 40 53.2 1945 2965 3214
3233 51.1 50 5465 3500 3481 51.2 50 0.1 287 74.7 41.8 40 52.7 1946 2966 18586 18603 50.4 44.4 5466 19224 19200 52.4 40 1.9 639 75.6 40.8 40 53.1 1947 2967
18586 18603 50.4 44.4 5467 19217 19196 50.2 40.9 0.2 632 75.6 41 40 53.1 1948 2968 18586 18603 50.4 44.4 5468 19215 19194 50.2 40.9 0.2 630 75.6 41 40
53.1 1949 2969 18590 18608 50.6 42.1 5469 19224 19200 52.4 40 1.8 635 75.6 40.9 40 53.2 1950 2970 15255 15273 50.3 52.6 5470 15767 15746 50.7 40.9 0.4
513 75.1 40.2 40 52.7 1951 2971 28942 28961 50.2 45 5471 29414 29395 50.5 50 0.3 473 76.8 44.6 40 53.9 1952 2972 18590 18608 50.6 42.1 5472 19217 19196
50.2 40.9 0.3 628 75.7 41.1 40 53.1 1953 2973 3055 3074 51.1 50 5473 3207 3187 50.5 47.6 0.6 153 74 45.1 40 52 1954 2974 18590 18608 50.6 42.1 5474 19215
19194 50.2 40.9 0.3 626 75.7 41.1 40 53.1 1955 2975 18591 18611 51.7 42.9 5475 19224 19200 52.4 40 0.7 634 75.7 41 40 53.6 1956 2976 18591 18611 51.7 42.9
5476 19217 19196 50.2 40.9 1.4 627 75.7 41.1 40 53.2 1957 2977 18591 18611 51.7 42.9 5477 19215 19194 50.2 40.9 1.4 625 75.7 41.1 40 53.2 1958 2978 28546
28565 52.2 50 5478 28672 28654 50.6 52.6 1.6 127 76.5 53.5 40 53.8 1959 2979 29191 29210 54.4 55 5479 29415 29395 53.4 52.4 1 225 75.7 45.8 40 54.1 1960
2980 7880 7900 50.3 42.9 5480 8190 8172 50.3 47.4 0 111 74.9 41.8 40 52.6 1961 2981 3167 3189 51.6 43.5 5481 3650 3631 53.1 50 1.5 484 75.8 42.1 40 53.6
1962 2982 28965 28984 52.9 55 5482 29306 29288 53.5 52.6 0.6 342 76.5 45.3 40 54.5 1963 2983 3166 3188 51.6 43.5 5483 3650 3631 53.1 50 1.5 485 75.8 42.3
40 53.7 1964 2984 8867 8887 52.3 47.6 5484 9101 9081 50.5 47.6 1.9 235 74.1 41.7 40 52.1 1965 2985 23843 23863 50.3 42.9 5485 24013 23995 50.3 47.4 0 171
73.7 43.3 40 51.8 1966 2986 3403 3421 53.1 52.6 5486 3503 3484 51.5 50 1.7 101 71.9 45.5 40 50.9 1967 2987 16549 16567 54.9 52.6 5487 16777 16756 53.4
45.5 1.5 229 74 41.5 40 52.9 1968 2988 8868 8889 50.4 40.9 5488 9109 9087 50.5 43.5 0.1 242 73.9 40.9 40 51.9 1969 2989 8861 8880 50 45 5489 9311 9292
50.7 50 0.6 451 75.3 41.2 40 52.9 1970 2990 8868 8889 50.4 40.9 5490 9257 9238 50.5 45 0.1 390 75 41 40 52.7 1971 2991 8868 8889 50.4 40.9 5491 9313 9294
50.4 50 0 446 75.4 41.5 40 53 1972 2992 23841 23859 50.5 52.6 5492 24013 23995 50.3 47.4 0.1 173 74 43.9 40 52 1973 2993 28548 28568 50.5 42.9 5493 28672
28654 50.6 52.6 0 125 76.2 52.8 40 53.6 1974 2994 8867 8888 52.7 45.5 5494 9310 9291 51.2 45 1.5 444 75.4 41.4 40 53.2 1975 2995 28968 28988 50.9 47.6 5495
29298 29279 52.6 55 1.8 331 76.2 44.7 40 53.7 1976 2996 19907 19926 52.1 55 5496 20615 20597 50.6 47.4 1.6 709 75.5 40.3 40 53.1 1977 2997 8861 8880 50
45 5497 9252 9235 50.1 50 0.1 392 75 41.1 40 52.6 1978 2998 19909 19929 50.7 52.4 5498 20615 20597 50.6 47.4 0.2 707 75.5 40.3 40 53.1 1979 2999 3361 3382
51.9 45.5 5499 3500 3481 51.2 50 0.7 140 74.1 46.4 40 52.3 1980 3000 18696 18715 51.7 50 5500 18881 18862 50.2 45 1.5 186 74.1 43.5 40 52.1 1981 3001
28968 28989 51.5 45.5 5501 29298 29279 52.6 55 1.1 331 76.2 44.7 40 53.9 1982 3002 19709 19730 51.3 40.9 5502 19923 19903 50.9 47.6 0.4 215 73.9 41.9 40
52.1 1983 3003 3361 3382 51.9 45.5 5503 3497 3478 51.3 50 0.6 137 74.1 46.7 40 52.4 1984 3004 3361 3384 53.7 41.7 5504 3495 3473 51.8 43.5 1.9 135 74 46.7
40 52.5 1985 3005 19709 19730 51.3 40.9 5505 19924 19905 50.1 50 1.2 216 73.9 41.7 40 51.8 1986 3006 16378 16397 50.4 45 5506 16711 16691 51 42.9 0.6 334
75.2 42.2 40 52.9 1987 3007 3361 3382 51.9 45.5 5507 3504 3485 50.4 45 1.5 144 74.3 46.5 40 52.2 1988 3008 18704 18724 50.8 47.6 5508 19406 19388 50.6
47.4 0.1 703 75.4 40.3 40 53.1 1989 3009 8868 8889 50.4 40.9 5509 9314 9295 51.1 50 0.7 447 75.5 41.6 40 53 1990 3010 3361 3382 51.9 45.5 5510 3503 3484
51.5 50 0.5 143 74.4 46.9 40 52.6 1991 3011 19709 19730 51.3 40.9 5511 19931 19912 50.9 55 0.4 223 74.2 42.2 40 52.3 1992 3012 16548 16566 54.9 52.6 5512
16777 16756 53.4 45.5 1.5 230 73.9 41.3 40 52.9 1993 3013 8868 8889 50.4 40.9 5513 9315 9296 50 45 0.4 448 75.4 41.5 40 52.9 1994 3014 22321 22341 51.6
42.9 5514 22460 22441 50.7 45 0.9 140 71.5 40 40 50.3 1995 3015 29182 29202 51.2 42.9 5515 29412 29393 50.3 45 0.9 231 75.4 45 40 53 1996 3016 22173
22193 51 42.9 5516 22460 22441 50.7 45 0.3 288 74.1 40.3 40 52.1 1997 3017 29181 29201 52.4 47.6 5517 29413 29393 51.1 42.9 1.3 233 75.5 45.1 40 53.3 1998
3018 18704 18724 50.8 47.6 5518 18881 18862 50.2 45 0.5 178 73.8 43.3 40 51.9 1999 3019 20751 20771 51.3 47.6 5519 21301 21278 51.3 41.7 0 551 75.5 41 40
53.3 2000 3020 29181 29200 50 45 5520 29412 29393 50.3 45 0.3 232 75.5 45.3 40 53 2001 3021 20751 20771 51.3 47.6 5521 21304 21283 50.5 40.9 0.8 554 75.5
41 40 53.1 2002 3022 29173 29197 52.2 40 5522 29415 29395 53.4 52.4 0.8 243 75.7 45.3 40 54.1 2003 3023 8867 8888 52.7 45.5 5523 9247 9226 52 45.5 0.7 381
75 41.2 40 53.2 2004 3024 8867 8888 52.7 45.5 5524 9255 9236 51.1 45 1.6 389 75 41.1 40 52.9 2005 3025 29178 29198 51.4 42.9 5525 29412 29393 50.3 45 1.1
235 75.5 45.1 40 53.1 2006 3026 3163 3185 53.6 47.8 5526 3650 3631 53.1 50 0.5 488 75.9 42.4 40 54.2 2007 3027 19800 19817 50.4 50 5527 20033 20016 50.4
50 0 234 74.9 43.6 41 52.7 2008 3028 8867 8886 50.7 50 5528 9376 9355 51 40.9 0.3 510 75.7 41.8 41 53.3 2009 3029 19800 19817 50.4 50 5529 19930 19910
50.6 47.6 0.2 131 72.6 43.5 41 51 2010 3030 24418 24439 52.9 45.5 5530 25082 25064 51.1 52.6 1.8 665 75.8 41.2 41 53.5 2011 3031 25771 25790 51.1 45 5531
26182 26161 51.2 40.9 0.1 412 74.8 40.3 41 52.8 2012 3032 12976 12994 50.3 47.4 5532 13326 13306 50.7 42.9 0.3 351 76.1 44.2 41 53.5 2013 3033 12976 12994
50.3 47.4 5533 13328 13307 51.2 45.5 0.9 353 76.1 44.2 41 53.5 2014 3034 2823 2844 50.4 45.5 5534 3500 3481 51.2 50 0.7 678 76.3 42.5 41 53.7 2015 3035
18009 18028 51.6 55 5535 18223 18205 53.3 52.6 1.7 215 74.5 43.3 41 52.7 2016 3036 8223 8240 50.4 50 5536 8933 8916 52.2 50 1.8 711 75.4 40.1 41 53 2017
3037 29180 29199 50.1 40 5537 29414 29395 50.5 50 0.4 235 75.5 45.1 41 53 2018 3038 19800 19817 50.4 50 5538 19925 19906 50.1 50 0.4 126 72.4 43.7 41
50.8 2019 3039 25772 25793 52.4 40.9 5539 26183 26162 52.8 45.5 0.4 412 74.8 40.3 41 53.2 2020 3040 14951 14975 52.2 40 5540 15152 15135 51.4 50 0.8 202
73.4 41.1 41 51.9 2021 3041 2823 2844 50.4 45.5 5541 3503 3484 51.5 50 1 681 76.4 42.6 41 53.7 2022 3042 18075 18095 50.6 47.6 5542 18231 18210 50.2 45.5
1.6 157 73.6 43.9 41 51.8 2023 3043 5 23 51.3 52.6 5543 269 251 51.1 52.6 0.1 265 76.4 46.4 41 53.9 2024 3044 9140 9159 50.1 45 5544 9249 9231 50.8 47.4 0.7
110 71.3 42.7 41 50 2025 3045 24418 24439 52.9 45.5 5545 24815 24791 54.5 40 1.6 398 75.9 43.2 41 54.1 2026 3046 8794 8813 51.6 45 5546 9358 9338 51 42.9
0.6 565 75.8 41.8 41 53.5 2027 3047 24418 24439 52.9 45.5 5547 24807 24786 51.7 45.5 1.2 390 75.9 43.3 41 53.8 2028 3048 2887 2405 51.6 52.6 5548 3186
3165 50.4 40.9 1.2 800 76.9 43.5 41 54.1 2029 3049 24418 24439 52.9 45.5 5549 24527 24506 51.7 40.9 1.2 110 71.3 42.7 41 50.5 2030 3050 24418 24439 52.9
45.5 5550 24517 24494 53.2 41.7 0.3 100 70.8 43 41 50.5 2031 3051 4255 4276 51.7 45.5 5551 4836 4817 51.2 45 0.5 582 75.9 41.9 41 53.6 2032 3052 24420
24440 50.8 42.9 5552 25082 25064 51.1 52.6 0.3 663 75.7 41 41 53.3 2033 3053 8867 8887 52.3 47.6 5553 9250 9232 51.6 47.4 0.8 384 75.1 41.4 41 53.2 2034
3054 14951 14975 52.2 40 5554 15275 15257 50.8 52.6 1.3 325 74.6 40.9 41 52.6 2035 3055 2387 2405 51.6 52.6 5555 3185 3164 51 45.5 0.7 799 76.9 43.6 41
54.2 2036 3056 8865 8884 50.4 45 5556 9252 9235 50.1 50 0.3 388 75.1 41.2 41 52.7

2037 3057 24420 24440 50.8 42.9 5557 24818 24797 51.6 40.9 0.8 399 75.8 42.9 41 53.4 2038 3058 24420 24440 50.8 42.9 5558 24807 24786 51.7 45.5 0.9 388
75.8 43 41 54.3 2039 3059 11541 11560 50.1 45 5559 12110 12090 51.1 42.9 1 570 75.9 41.9 41 53.3 2040 3060 2387 2405 51.6 52.6 5560 2672 2653 51.6 50 0
286 77 47.6 41 54.5 2041 3061 24420 24440 50.8 42.9 5561 24526 24506 50.3 42.9 0.5 107 70.8 42.1 41 49.8 2042 3062 11540 11557 50.4 50 5562 12110 12090
51.1 42.9 0.7 571 76 42 41 53.4 2043 3063 6263 6282 50.9 45 5563 6483 8463 50.2 42.9 0.7 221 73.7 41.2 41 51.8 2044 3064 24418 24440 55 47.8 5564 24815
24791 54.5 40 0.5 398 75.9 43.2 41 54.6 2045 3065 18075 118095 50.6 47.6 5565 18233 18214 52 50 1.4 159 74 44.7 41 52.1 2046 3066 18075 18095 50.6 47.6
5566 18233 18215 51.3 52.6 0.7 159 74 44.7 41 52.1 2047 3067 2429 2447 50.2 47.4 5567 3055 3036 50.6 50 0.4 627 76.3 42.6 41 53.6 2048 3068 18075 19800 19818
52.1 52.6 5568 19917 19896 50.9 45.5 1.2 118 71.9 43.2 41 50.7 2049 3069 24481 24500 50.1 45 5569 24936 24919 51.8 50 1.7 456 75.7 42.1 41 53.1 2050 3070
276 294 50.5 47.4 5570 713 695 50.7 47.4 0.2 438 79.1 50.7 41 55.7 2051 3071 19801 19819 53.2 52.6 5571 19927 19908 52.1 55 1.1 127 72.7 44.1 41 51.6 2052
2072 19801 19819 53.2 52.6 5572 19925 19905 51.4 52.4 1.9 125 72.5 44 41 51.3 2053 3073 3800 3824 53.6 40 5573 4318 4294 54.4 40 0.8 519 75.3 40.8 41 53.9
3054 3074 11540 11557 50.4 50 5574 12258 12238 50.3 42.9 0.2 719 76.2 42 41 53.5 2054 3074 5548 24502 50.3 42.9 5575 24938 24921 50.4 50 0.1 457 75.6
41.8 41 53.1 2056 3076 24482 24502 50.3 42.9 5576 24807 24786 51.7 45.5 1.4 326 75.4 42.9 41 53.5 2057 3077 8867 8888 52.7 45.5 5577 9364 9346 53.9 52.6 1.2
498 75.8 42.2 41 54 2058 3078 24481 24502 51.5 45.5 5578 25080 25062 53.5 52.6 2 600 75.5 40.8 41 53.4 2059 3079 8865 8884 50.4 45 5579 9107 9086 51.6
45.5 1.2 243 74 41.2 41 52 2060 3080 8867 8888 52.7 45.5 5580 9313 9293 52.1 47.6 0.6 447 75.5 41.6 41 5

379 398 50.1 45 5589 941 922 50.5 50 0.4 563 78.7 48.8 41 55.2 2070 3090 24483 24503 51 42.9 5590 24936 24919 51.8 50 0.8 454 75.7 42.1 41 53.4 2071 3091 19802 19820 53 52.6 5591 19927 19908 52.1 55 0.8 126 72.8 44.4 41 51.7 2072 3092 9934 9953 50.7 50 5592 10670 10649 51.3 40.9 0.6 737 75.7 40.8 41 53.3 2073 3093 8866 8885 51.1 45 5593 9312 9293 50.6 45 0.5 447 75.4 41.4 41 53 2074 3094 19846 19866 51.2 42.9 5594 20033 20016 50.4 50 0.8 188 74.2 43.6 41 52.2 2075 3095 19848 19867 50.7 45 5595 20033 20016 50.4 50 0.3 186 74.1 43.5 41 52.1 2076 3096 9538 9558 50.9 42.9 5596 10017 9999 52.8 52.6 0.1 9 480 75.5 41.5 41 53.2 2077 3097 8220 8238 51.5 47.4 5597 8933 8916 52.2 50 0.7 714 75.4 40.1 41 53.3 2078 3098 9140 9159 50.1 45 5598 9249 9232 50 50 0.1 110 71.3 42.7 41 50 2079 3099 12976 12994 50.3 47.4 5599 13332 13312 50.9 47.6 0.6 357 76.2 44.3 41 53.5 2080 3100 15752 15772 50.8 47.6 5600 16174 16154 50.4 42.9 0.4 423 75.1 40.9 41 52.8 2081 3101 18074 18094 51.1 42.9 5601 18232 18212 50.6 47.6 0.5 159 73.7 44 41 51.9 2082 3102 24559 24579 52 52.4 5602 25081 25063 52.4 52.6 0.4 523 75.0 41 41 53.5 2083 3103 24559 24579 52 52.4 5603 25079 25061 52.7 52.6 0.7 521 75.5 41.3 41 53.6 2084 3104 3169 3191 52.1 47.8 5604 3650 3631 53.1 50 1 485 75.9 42.3 41 53.8 2085 3105 28117 28135 50.6 52.6 0.6 5605 28672 28654 50.6 52.6 0.1 556 80 52 41 56.3 2086 3106 1809 1829 50.6 42.9 5606 2103 2082 52 45.5 1.5 295 75.4 43.4 41 53 2087 3107 24559 24579 52 52.4 5607 24933 24913 51.1 42.9 0.8 375 75.6 42.7 41 53.4 2088 3108 1809 1829 50.6 42.9 5608 2113 2094 50.1 45 0.4 305 75.4 43.3 41 52.9 2089 3109 28116 28134 50.8 47.4 5609 28505 28487 50.2 47.4 0.6 390 79.4 51.8 41 55.8 2090 3110 1808 1828 50.6 42.9 5610 2103 2082 52 45.5 1.5 296 75.5 43.6 41 53.1 2091 3111 15951 15975 53.1 40 5611 16210 16192 54.3 52.6 1.2 260 74.3 41.5 41 53.1 2092 3112 8865 8884 50.4 45 5612 9341 9322 51.1 50 0.7 477 75.6 41 41 53.1 2093 3113 15 33 50.7 52.6 5613 642 622 51.6 47.6 0.9 628 79 49.2 41 55.6 2094 3114 8861 8880 50.2 45 5614 9107 9086 51.6 45.5 1.4 247 73.9 40.9 41 51.9 2095 3115 1808 1828 50.6 42.9 5615 2113 2094 50.1 45 0.4 306 75.5 43.5 41 53 2096 3116 24562 24580 50.1 52.6 5616 24933 24913 51.1 42.9 1.1 372 75.5 42.5 41 53 2097 3117 28116 28134 50.8 47.4 5617 28672 28654 50.6 52.6 0.2 557 80 51.9 41 56.2 2098 3118 24560 24580 51.3 52.4 5618 25081 25063 52.4 52.6 1.1 522 75.4 41 41 53.3 2099 3119 24560 24580 51.3 52.4 5619 25079 25061 52.7 52.6 1.4 520 75.5 41.2 41 53.3 2100 3120 16366 16384 50.3 52.6 5620 16775 16755 51.1 42.9 0.7 410 75.1 41 41 52.7 2101 3121 16366 16384 50.3 52.6 5621 16774 16754 50.4 42.9 0.1 409 75.1 41.1 41 52.8 2102 3122 24569 24590 56.6 54.5 5622 25089 25070 55.8 55 0.8 521 75.4 40.9 41 54.6 2103 3123 24569 24590 56.6 54.5 5623 25088 25069 55 50 1.6 520 75.3 40.8 41 54.3 2104 3124 24567 24590 57.8 54.2 5624 25095 25072 59.3 54.2 1.5 529 75.4 40.8 41 55.2 2105 3125 24568 24591 58.9 54.2 5625 25095 25072 59.3 54.2 0.4 528 75.3 40.7 41 55.5 2106 3126 24568 24591 58.9 54.2 5626 25091 25070 59.1 54.5 0.2 524 75.4 40.8 41 55.5 2107 3127 24568 24591 58.9 54.2 5627 25090 25069 58.3 54.5 0.6 523 75.4 40.9 41 55.4 2108 3128 16366 16384 50.3 52.6 5628 16774 16753 51.1 40.9 0.8 409 75.1 41.1 41 52.8 2109 3129 1806 1825 51.1 45 5629 2103 2082 52 45.5 1 298 75.5 43.6 41 53.3 2110 3130 8374 8395 52.4 45.5 5630 9107 9086 51.6 45.5 0.8 734 75.5 40.2 41 53.4 2111 3131 24622 24643 57.1 54.5 5631 24935 24913 56.1 47.8 1 314 74.5 40.8 41 54.1 2112 3132 9130 9150 51.3 42.9 5632 9358 9338 51 42.9 0.3 229 74.5 42.8 41 52.5 2113 3133 12936 12957 53.7 45.5 5633 13530 13511 55.6 55 1.9 595 77.4 45.4 41 55.4 2114 3134 8373 8391 50.7 47.4 5634 9107 9086 51.6 45.5 0.9 735 75.4 40.1 41 53.1 2115 3135 1352 1371 56.1 55 5635 1701 1678 54.3 41.7 1.8 350 76.7 45.7 41 55.1 2116 3136 8867 8886 50.7 50 5636 9342 9323 52.1 50 1.4 476 75.7 42 41 53.3 2117 3137 1352 1371 56.1 55 5637 1701 1677 54.7 40 1.4 350 76.7 45.7 41 55.2 2118 3138 9130 9150 51.3 42.9 5638 9249 9232 50 50 1.3 120 71.7 42.5 41 50.3 2119 3139 16861 16880 50.8 50 5639 17062 17045 50.2 50 0.6 202 74.8 44.6 41 52.5 2120 3140 9130 9150 51.3 42.9 5640 9249 9231 50 50 1.8 47.4 42.5 41 50.5 2121 3141 9130 9150 51.3 42.9 5641 9249 9230 51.5 45 0.2 120 71.7 42.5 41 50.7 2122 3142 8372 8390 50.7 47.4 5642 9060 9039 50.3 40.9 0.4 689 75.4 40.2 41 53 2123 3143 18074 18093 50.3 45 5643 18232 18212 50.6 47.6 0.3 159 73.7 44 41 51.8 2124 3144 2671 2692 52.1 40.9 5644 3193 3172 52.6 50 0.5 523 75.8 41.9 41 53.8 2125 3145 16562 16581 52.6 50 5645 17064 17045 51.4 50 1.2 503 75.8 42.1 41 53.6 2126 3146 2671 2692 52.1 40.9 5646 3193 3173 51.4 47.6 0.7 523 75.8 41.9 41 53.6 2127 3147 8372 8390 50.7 47.4 5647 9107 9086 51.6 45.5 0.9 736 75.5 40.2 41 53.1 2128 3148 12726 12746 51.3 47.6 5648 13321 13301 50.3 42.9 0.9 596 76.7 43.6 41 53.9 2129 3149 8867 8886 50.7 50 5649 9312 9293 50.6 45 0.5 41 41 53 2130 3150 16562 16580 51.9 52.6 5650 17062 17045 50.2 50 1.7 501 75.8 42.1 41 53.2 2131 3151 27377 27397 53.4 47.6 5651 27674 27653 52.5 40.9 0.9 298 74.3 40.6 41 52.8 2132 3152 16556 16573 50.3 50 5652 17111 17090 51.1 40.9 0.8 556 76.1 42.4 41 53.5 2133 3153 7815 7833 51.5 52.6 5653 8531 8512 52 45 0.5 717 75.7 40.7 41 53.5 2134 3154 3223 3241 50.2 52.6 5654 3494 3473 50.4 40.9 0.2 272 74.6 41.9 41 52.4 2135 3155 8372 8390 50.7 47.4 5655 9109 9087 50.5 43.5 0.1 738 75.4 40.1 41 53.1 2136 3156 3041 3065 57.7 48 5656 3650 3628 56.3 47.8 1.4 610 76.3 42.8 41 55.4 2137 3157 9569 9597 53 43.5 5657 10017 9999 52.8 52.6 0.3 449 75.4 41.4 41 53.7 2138 3158 3041 3065 57.7 48 5658 3649 3625 56.6 44 1.2 609 76.3 42.7 41 55.5 2139 3159 13176 13196 51.4 47.6 5659 13321 13301 50.3 42.9 1 146 73.3 43.8 41 51.5 2140 3160 16366 16385 52.9 55 5660 16775 16755 51.1 42.9 1.8 410 75.1 41 41 53 2141 3161 16366 16385 52.9 55 5661 16775 16754 51.7 40.9 1.1 410 75.1 41 41 53.2 2142 3162 16366 16385 52.9 55 5662 16774 16753 51.1 40.9 1.8 409 75.1 41.1 41 53 2143 3163 1402 1422 50.2 42.9 5663 2104 2084 50.6 42.9 0.4 703 76.7 43.2 41 53.8 2144 3164 1402 1422 50.2 42.9 5664 1697 1678 50.3 45 0.1 296 76 44.9 41 53.4 2145 3165 3055 3076 52.4 45.5 5665 3503 3484 51.5 50 1 449 76.1 43.2 41 53.8 2146 3166 15211 15230 50.2 45 5666 16001 15980 51.1 45.5 0.9 791 75.6 40.3 41 53.1 2147 3167 12267 12290 54.5 41.7 5667 12414 12392 53.9 43.5 0.6 148 72.2 41.2 41 51.8 2148 3168 8861 8880 50.2 45 5668 9256 9237 50.8 45 0.6 396 75 40.9 41 52.6 2149 3169 3049 3071 56.3 52.2 5669 3650 3628 56.3 47.8 0 602 76.4 42.9 41 55.4 2150 3170 3049 3071 56.3 52.2 5670 3648 3625 55.5 41.7 0.8 600 76.3 42.7 41 55.2 2151 3171 8861 8880 50.2 45 5671 9313 9294 50.4 50 0.3 453 75.3 41.3 41 52.9 2152 3172 12352 12375 52.9 41.7 5672 12911 12891 51.2 47.6 1.7 560 76.1 42.5 41 53.7 2153 3173 7965 7985 51.9 42.9 5673 8531 8512 52 45 0.2 567 75.1 40 41 53.2 2154 3174 18017 18036 54.8 55 5674 18233 18212 53.5 50 1.3 217 74.7 43.8 41 53.5 2155 3175 8867 8886 50.7 50 5675 9257 9238 50.5 45 0.2 391 75.1 41.2 41 52.8 2156 3176 3221 3239 51.5 52.6 5676 3494 3473 50.4 40.9 1.1 274 74.5 41.6 41 52.4 2157 3177 1402 1422 50.2 42.9 5677 1697 1677 51 42.9 0.8 296 76 44.9 41 53.4 2158 3178 1402 1422 50.2 42.9 5678 1697 1676 51.7 40.9 1.5 296 76 44.9 41 53.4 2159 3179 18011 18032 55.7 54.5 5679 18220 18201 56.1 55 0.4 210 74.5 43.3 41 53.9 2160 3180 12726 12746 51.3 47.6 5680 13329 13308 50.5 40.9 0.8 604 76.6 43.5 41 53.9 2161 3181 1402 1425 52.8 41.7 5681 1698 1678 51.7 42.9 1.1 297 76 44.8 41 53.8 2162 3182 18013 18032 52.2 55 5682 18223 18205 53.3 52.6 1.1 211 74.4 43.1 41 52.8 2163 3183 3777 3797 51.7 47.6 5683 4444 4424 50.6 42.9 1.1 668 75.6 40.7 41 53.2

2164 3184 3777 3797 51.7 47.6 5684 4445 4425 50.6 42.9 1.1 669 75.6 40.7 41 53.2 2165 3185 7876 7895 51.5 45 5685 8189 8170 50.6 50 0.9 314 75.1 42.4 41 52.9 2166 3186 18014 18032 51 52.6 5686 18229 18209 50.1 42.9 0.8 216 74.2 42.6 41 52.1 2167 3187 1402 1425 52.8 41.7 5687 1697 1677 51 42.9 1.8 296 76 44.9 41 53.6 2168 3188 1402 1425 52.8 41.7 5688 1697 1676 51.7 40.9 1.1 296 76 44.9 41 53.8 2169 3189 1402 1425 52.8 41.7 5689 1501 1481 51.2 42.9 1.6 100 72 46 41 50.9 2170 3190 12366 12384 51.7 52.6 5690 13155 13138 50.4 50 1.3 790 76.8 43.4 41 54 2171 3191 27361 27380 52.4 55 5691 27573 27552 52.3 40.9 0.1 213 75 44.6 41 53.3 2172 3192 18006 18028 54.5 52.2 5692 18220 18201 56.1 55 1.6 215 74.5 43.3 41 53.6 2173 3193 1442 1461 51.6 55 5693 1872 1854 53.2 52.6 1.6 431 76.2 43.6 41 53.9 2174 3194 27361 27380 52.4 55 5694 27567 27547 51.1 42.9 1.3 207 75.1 44.9 41 53 2175 3195 9131 9151 50.4 42.9 5695 9249 9230 51.5 45 1.2 119 71.8 42.9 41 50.5 2176 3196 3217 3236 51.1 50 5696 3504 3485 50.4 45 0.7 288 74.8 42 41 52.6 2177 3197 18011 18029 51.3 52.6 5697 18232 18212 50.6 47.6 0.7 222 74.8 43.7 41 52.6 2178 3198 3055 3074 51.1 50 5698 3503 3484 51.5 50 0.4 449 76.1 43.2 41 53.7 2179 3199 8866 8886 52.3 47.6 5699 9364 9346 53.9 52.6 1.6 499 75.8 42.1 41 53.9 2180 3200 16368 16387 50.2 45 5700 16774 16752 52.2 43.5 2 407 75 40.8 41 52.7 2181 3201 8859 8879 50 42.9 5701 9252 9235 50.1 50 0.1 394 75.1 41.1 41 52.6 2182 3202 9131 9151 50.4 42.9 5702 9249 9231 50.8 47.4 0.5 119 71.8 42.9 41 50.5 2183 3203 3217 3236 51.1 50 5703 3494 3473 50.4 40.9 0.7 278 74.6 41.7 41 52.4 2184 3204 8859 8879 50 42.9 5704 9341 9322 51.1 50 1.1 483 75.6 41.6 41 53 2185 3205 9131 9151 50.4 42.9 5705 9249 9232 50 50 0.3 119 71.8 42.9 41 50.4 2186 3206 8867 8886 50.7 50 5706 9248 9229 50.1 45 0.5 382 75.1 41.4 41 52.7 2187 3207 27366 27384 52.2 52.6 5707 27576 27555 51 40.9 1.2 211 74.8 44.1 41 52.8 2188 3208 1442 1461 51.6 55 5708 1879 1861 53 52.6 1.4 438 76.2 43.6 41 54 2189 3209 12366 12384 51.7 52.6 5709 12724 12705 52.4 55 0.7 359 75.6 42.9 41 53.5 2190 3210 12366 12384 51.7 52.6 5710 12498 12480 50 47.4 1.6 133 73 44.4 41 51.2 2191 3211 98 118 50.6 42.9 5711 713 695 50.7 47.4 0.1 616 79 49.4 41 55.6 2192 3212 12373 12391 50.8 47.4 5712 13155 13138 50.4 50 0.4 783 76.8 43.4 41 54 2193 3213 18011 18030 52.9 55 5713 18230 18209 51.3 45.5 1.6 220 74.5 43.2 41 52.7 2194 3214 1402 1426 54.1 40 5714 1700 1676 53.9 40 0.2 299 76 44.8 41 54.5 2195 3215 18011 18030 52.9 55 5715 18223 18205 53.3 52.6 0.5 213 74.4 43.2 41 53.1 2196 3216 1402 1426 54.1 40 5716 1698 1677 52.3 40.9 1.8 297 76 44.8 41 54 2197 3217 16463 16483 51.3 42.9 5717 17032 17011 52 45.5 0.7 570 76 42.1 41 53.7 2198 3218 18009 18030 54.6 54.5 5718 18220 18201 56.1 55 1.6 212 74.5 43.4 41 53.6 2199 3219 1402 1426 54.1 40 5719 1700 1678 52.9 43.5 1.3 299 76 44.8 41 54.2 2200 3220 9131 9151 50.4 42.9 5720 9358 9338 51 42.9 0.6 228 74.6 43 41 52.4 2201 3221 3055 3075 51.8 47.6 5721 3503 3484 51.5 50 0.3 449 76.1 43.2 41 53.8 2202 3222 18013 18031 50.6 52.6 5722 18232 18212 50.6 47.6 0 220 74.7 43.6 41 52.6 2203 3223 8794 8813 51.6 45 5723 9249 9230 51.5 45 1.4 456 75.4 41.4 41 53.4 2204 3224 8794 8813 51.6 45 5724 9249 9231 50.8 47.4 0.8 456 75.4 41.4 41 53.1 2205 3225 16549 16567 54.9 52.6 5725 17065 17045 53.1 47.6 1.9 517 76 42.4 41 54.2 2206 3226 8794 8813 51.6 45 5726 9249 9232 50 50 1.6 456 75.4 41.4 41 52.9 2207 3227 1402 1426 54.1 40 5727 2104 2082 53.5 43.5 0.6 703 76.7 43.2 41 54.8 2208 3228 9927 9946 51.3 50 5728 10356 10336 52.4 47.6 1.1 430 75.6 42.1 41 53.4 2209 3229 3219 3238 50.7 50 5729 3494 3473 50.4 40.9 0.3 276 74.5 41.7 41 52.4 2210 3230 16549 16567 54.9 52.6 5730 17033 17011 53.2 43.5 1.7 485 75.8 42.1 41 54.1 2211 3231 18014 18032 51 52.6 5731 18702 18685 50.2 50 0.8 689 76.2 42.2 41 53.5 2212 3232 8794 8813 51.6 45 5732 9333 9315 52.2 52.6 0.6 540 75.9 42 41 53.7 2213 3233 8867 8888 52.7 45.5 5733 9249 9229 53 47.6 0.2 383 75.2 41.5 41 53.5 2214 3234 18009 18028 51.6 55 5734 18229 18209 50.1 42.9 1.5 221 74.5 43 41 52.3 2215 3235 9633 9651 51 47.4 5735 10017 9999 52.8 52.6 1.8 385 75.6 42.6 41 53.3 2216 3236 9915 9935 51.8 47.6 5736 10449 10428 51.9 40.9 0.1 535 75.4 40.9 41 53.4 2217 3237 29259 29277 50.9 52.6 5737 29414 29395 50.5 50 0.3 156 74.5 46.2 41 52.4 2218 3238 8868 8889 50.4 40.9 5738 9317 9297 50.5 42.9 0.1 450 75.4 41.6 41 53 2219 3239 29257 29276 51.3 50 5739 29414 29395 50.5 50 0.8 158 74.6 46.2 41 52.5 2220 3240 13176 13196 51.4 47.6 5740 13332 13312 50.9 47.6 0.5 157 73.6 43.9 41 51.9 2221 3241 9918 9938 51.4 47.6 5741 10449 10428 51.9 40.9 0.5 53.2 75.4 40.8 41 53.3 2222 3242 13176 13196 51.4 47.6 5742 13856 13835 50.1 45.5 1.3 681 75.8

2233 3253 18005 18024 51.1 50 5753 18233 18214 52 50 0.9 229 74.9 43.7 41 52.8 2234 3254 3016 3036 50.2 42.9 5754 3503 3484 51.5 50 1.2 488 76.3 43.4 41 53.6 2235 3255 7723 7741 52.2 52.6 5755 8054 8035 50.4 50 1.7 332 75 41.9 41 52.8 2236 3256 29200 29224 54.2 40 5756 29358 29339 52.8 50 1.4 159 74.5 45.9 41 53.1 2237 3257 3016 3036 50.2 42.9 5757 3504 3485 50.4 45 0.1 489 76.3 43.4 41 53.6 2238 3258 985 1004 51.1 50 5758 1499 1482 50.1 50 1.1 515 76.5 43.7 41 53.7 2239 3259 8866 8885 51.4 45 5759 9257 9238 50.5 45 0.6 392 75 41.1 41 52.8 2240 3260 3016 3036 50.2 42.9 5760 3647 3628 50.6 45 0.4 632 76.4 42.9 41 53.7 2241 3261 13039 13058 51.8 50 5761 13749 13727 50.5 43.5 1.7 711 76.7 43.2 41 53.9 2242 3262 24096 24119 54.4 41 5762 24815 24792 53.4 41 7.1 720 75.8 41 41 54.2 2243 3263 17840 17859 50.8 45 5763 18229 18209 50.1 42.9 0.7 390 74.7 40.3 41 52.4 2244 3264 15255 15273 50.3 52.6 5764 15647 15628 51 45 0.7 393 75.1 41.2 41 52.7 2245 3265 988 1006 52.2 52.6 5765 1500 1482 50.6 47.4 1.6 513 76.5 43.7 41 53.8 2246 3266 24035 24053 52.2 52.6 5766 24527 24508 50.5 45 1.7 493 75.4 41.2 41 53 2247 3267 18616 18636 51.4 47.6 5767 19215 19194 50.2 40.9 1.1 600 75.7 41.2 41 53.1 2248 3268 8374 8393 51.2 45 5768 9101 9081 50.5 47.6 0.7 728 75.5 40.2 41 53.1 2249 3269 17840 17859 50.8 45 5769 18238 18219 50.3 45 0.5 399 75 40.9 41 52.7 2250 3270 24030 24047 50.7 50 5770 24526 24506 50.3 42.9 0.4 497 75.5 41.2 41 53 2251 3271 24030 24047 50.7 50 5771 24527 24507 51 42.9 0.3 498 75.4 41.2 41 53.1 2252 3272 17840 17859 50.8 45 5772 18239 18220 50 45 0.8 400 74.9 40.8 41 52.6 2253 3273 985 1008 56.1 50 5773 1626 1602 56.1 44 0 642 77.1 44.5 41 55.9 2254 3274 13039 13057 51.1 52.6 5774 13749 13727 50.5 43.5 0.6 711 76.7 43.2 41 53.9 2255 3275 29200 29223 53.7 41 57 5775 29358 29339 52.8 50 0.9 159 74.5 45.9 41 53.1 2256 3276 1046 1063 50.3 50 5776 1498 1481 51 50 0.7 453 76.4 43.9 41 53.7 2257 3277 24019 24039 50.1 42.9 5777 24527 24508 50.5 45 0.4 509 75.4 41.1 41 52.9 2258 3278 24014 24035 50.6 40.9 5778 24527 24508 50.5 45 0.1 514 75.5 41.2 41 53.1 2259 3279 1046 1063 50.3 50 5779 1497 1480 50.3 50 0.1 452 76.5 44 41 53.7 2260 3280 29201 29222 51 40.9 5780 29358 29339 52.8 50 1.9 158 74.3 45.6 41 52.4 2261 3281 18583 18603 54.8 47.6 5781 18696 18672 53.9 40 0.8 114 70.5 40.4 41 50.6 2262 3282 12977 12996 50.2 40 5782 13326 13306 50.7 42.9 0.4 350 76 44 41 53.4 2263 3283 23843 23863 50.3 42.9 5783 24088 24070 50.5 52.6 0.2 246 75.7 45.1 41 53.2 2264 3284 29200 29221 52.6 45.5 5784 29358 29339 52.8 50 0.2 159 74.5 45.9 41 53 2265 3285 23843 23863 50.3 42.9 5785 24091 24073 50.9 52.6 0.5 249 75.8 45.4 41 53.3 2266 3286 17792 17813 51.6 40.9 5786 18231 18210 52.2 45.5 0.6 440 75 40.5 41 53.1 2267 3287 23843 23863 50.3 42.9 5787 24094 24076 50.9 52.6 0.5 252 75.9 45.6 41 53.4 2268 3288 8374 8393 51.2 45 5788 9109 9087 50.5 43.5 0.6 736 75.4 40.1 41 53.1 2269 3289 17793 17813 50 42.9 5789 18223 18206 51.8 50 1.7 431 74.9 40.4 41 52.5 2270 3290 1046 1063 50.3 50 5790 1481 1463 50.5 47.4 0.2 436 76.2 43.6 41 53.6 2271 3291 23842 23862 50.9 47.6 5791 24093 24075 50.9 52.6 0 252 75.9 45.6 41 53.5 2272 3292 23842 23862 50.9 47.6 5792 24527 24507 51 42.9 0.1 686 76.1 41.8 41 53.6 2273 3293 2823 2844 50.4 45.5 5793 3082 3058 52.3 40 1.9 260 74.3 41.5 41 52.3 2274 3294 18550 18571 50.4 40.9 5794 19316 19295 50 40.9 0.4 767 75.5 40.3 41 53 2275 3295 23841 23860 52.1 55 5795 24527 24507 51 42.9 1.1 687 76.1 41.9 41 53.7 2276 3296 23841 23860 52.1 55 5796 24527 24508 50.5 45 1.6 687 76.1 41.9 41 53.5 2277 3297 17793 17813 50 42.9 5797 18233 18215 51.3 52.6 1.3 441 75.1 40.8 41 52.7 2278 3298 1 50 5798 269 251 51.1 52.6 1.1 269 76.4 46.5 41 53.6 2279 3299 23841 23859 50.5 52.6 5799 24094 24076 50.9 52.6 0.4 254 76.1 46.1 41 53.5 2280 3300 8908 8925 51.1 50 5800 9249 9231 50.8 47.4 0.2 342 75.1 41.8 41 52.9 2281 3301 8908 8925 51.1 50 5801 9249 9230 51.5 45 0.5 342 75.1 41.8 41 53 2282 3302 23841 23859 50.5 52.6 5802 24500 24481 50.1 45 0.4 660 76.1 42.1 41 53.4 2283 3303 23841 23859 50.5 52.6 5803 24526 24506 50.3 42.9 0.2 686 76.1 42 41 53.5 2284 3304 18225 18243 51.4 52.6 5804 18632 18611 50.2 40.9 1.2 408 75.7 42.6 41 53.2 2285 3305 3794 3812 52.9 52.6 5805 4318 4294 54.4 40 1.5 525 75.5 41.1 41 53.8 2286 3306 8908 8925 51.1 50 5806 9245 9226 50 45 1 338 74.9 41.4 41 52.5 2287 3307 17790 17811 51.6 40.9 5807 18231 18210 52.2 45.5 0.6 442 75 40.5 41 53.1 2288 3308 18077 18100 54.7 45.8 5808 18443 18424 55.9 55 1.3 367 75.8 43.3 41 54.6 2289 3309 23838 23857 50.4 50 5809 24527 24507 51 42.9 0.6 690 76 41.7 41 53.4 2290 3310 23838 23857 50.4 50 5810 24527 24508 50.5 45 0.1 690 76 41.7 41 53.4 2291 3311 23735 23752 51.2 50 5811 24013 23995 50.3 47.4 0.8 279 74.1 40.5

41 52.1 2292 3312 18080 18100 53.3 47.6 5812 18220 18202 54.8 52.6 1.5 141 73.1 44 41 52.3 2293 3313 18081 18100 51.7 50 5813 18223 18206 51.8 50 0.1 143 73.2 44.1 41 51.9 2294 3314 18081 18100 51.7 50 5814 18231 18210 52.2 45.5 0.5 151 73.6 44.4 41 52.1 2295 3315 18081 18100 51.7 50 5815 18233 18214 52 50 0.4 153 74 45.1 41 52.4 2296 3316 18081 18100 51.7 50 5816 18233 18215 51.3 52.6 0.4 153 74 45.1 41 52.3 2297 3317 8911 8928 51.9 50 5817 9252 9235 50.1 50 1.8 342 75 41.5 41 52.6 2298 3318 17791 17811 50 42.9 5818 18223 18206 51.8 50 1.7 433 74.9 40.4 41 52.5 2299 3319 8911 8928 51.9 50 5819 9249 9231 50.8 47.4 1 339 75 41.6 41 52.8 2300 3320 12352 12375 52.9 41.7 5820 12912 12892 53.6 52.4 0.8 561 76.2 42.6 41 54.3 2301 3321 8911 8928 51.9 50 5821 9249 9230 51.5 45 0.3 339 75 41.6 41 53 2302 3322 12352 12375 52.9 41.7 5822 12995 12976 51.1 45 1.8 644 76.4 42.9 41 53.9 2303 3323 17791 17811 50 42.9 5823 18233 18215 51.3 52.6 1.3 443 75.1 40.9 41 52.7 2304 3324 12977 12996 50.2 40 5824 13328 13307 51.2 45.5 1 352 76 44 41 53.4 2305 3325 12977 12996 50.2 40 5825 13329 13308 50.5 40.9 0.3 353 76 43.9 41 53.4 2306 3326 8911 8928 51.9 50 5826 9245 9226 50 45 1.8 335 74.8 41 41 52.5 2307 3327 8913 8931 55.5 52.6 5827 9252 9231 54 45.5 1.5 340 74.9 41.5 41 53.7 2308 3328 1402 1425 52.8 41.7 5828 1501 1480 51.9 40.9 0.9 100 72 46 41 51.1 2309 3329 24941 24960 52 50 5829 25646 25627 50.5 45 1.5 706 75.4 40.2 41 53 2310 3330 17608 17628 50.9 42.9 5830 17769 17749 50 42.9 0.9 162 72.4 40.7 41 50.8 2311 3331 24941 24960 52 50 5831 25404 25386 52.7 52.6 0.7 464 75.3 41.2 41 53.4 2312 3332 24941 24960 52 50 5832 25401 25383 50.6 47.4 1.4 461 75.2 41 41 53 2313 3333 24941 24960 52 50 5833 25400 25382 51.4 52.6 0.6 460 75.3 41.1 41 53.2 2314 3334 17608 17628 50.9 42.9 5834 18231 18210 52.2 45.5 1.2 624 75.2 40.1 41 53.1 2315 3335 18081 18099 51.2 52.6 5835 18232 18212 50.6 47.6 0.6 152 73.8 44.7 41 51.9 2316 3336 7725 7742 50 50 5836 7853 7833 50.7 47.6 0.7 129 71.2 40.3 41 49.9 2317 3337 8913 8931 55.5 52.6 5837 9252 9230 54.5 43.5 1 340 74.9 41.5 41 53.9 2318 3338 17608 17628 50.9 42.9 5838 18233 18215 51.3 52.6 0.4 626 75.3 40.3 41 53.1 2319 3339 19715 19735 52.5 47.6 5839 19931 19912 50.9 55 1.6 217 74 41.9 41 52.2 2320 3340 8913 8931 55.5 52.6 5840 9248 9226 54.7 47.8 0.7 336 74.9 41.4 41 53.9 2321 3341 18081 18099 51.2 52.6 5841 18642 18622 50.5 42.9 0.7 562 76.2 42.7 41 53.6 2322 3342 2823 2844 50.4 45.5 5842 3189 3168 51 45.5 0.5 367 75.6 42.8 41 53.2 2323 3343 19715 19735 52.5 47.6 5843 19927 19908 52.1 55 0.3 213 73.9 41.8 41 52.4 2324 3344 2823 2844 50.4 45.5 5844 3190 3169 50.7 45.5 0.2 368 75.6 42.7 41 53.1 2325 3345 28936 28956 55.2 52.4 5845 29306 29287 54.6 55 0.6 371 76.6 45.3 41 55.1 2326 3346 28936 28956 55.2 52.4 5846 29306 29285 56.7 54.5 1.6 371 76.6 45.3 41 55.3 2327 3347 28523 28544 51.6 40.9 5847 29298 29280 51.4 52.6 0.2 776 78.4 47.3 41 55.4 2328 3348 24180 24199 50.3 40 5848 24933 24913 51.1 42.9 0.9 754 75.8 40.8 41 53.2 2329 3349 19715 19735 52.5 47.6 5849 19925 19905 51.4 52.4 1.1 211 73.8 41.7 41 52.2 2330 3350 4645 4665 50.2 42.9 5850 4846 4817 51.2 45 0.9 192 75 45.3 41 52.6 2331 3351 18081 18099 51.2 52.6 5851 18702 18685 50.2 50 1 622 76.2 42.4 41 53.5 2332 3352 28522 28542 50.2 42.9 5852 29298 29280 51.4 52.6 1.2 777 78.4 47.2 41 55.1 2333 3353 24179 24199 52.7 42.9 5853 24740 24717 52.5 41.7 0.2 562 76 42.2 41 54 2334 3354 19715 19735 52.5 47.6 5854 19909 19885 52.5 40 0 195 73.3 41 41 52.1 2335 3355 1810 1830 51.2 42.9 5855 2103 2082 52 45.5 0.8 294 75.5 43.5 41 53.3 2336 3356 19716 19737 52.2 45.5 5856 19909 19885 52.5 40 0.3 194 73.1 40.7 41 51.9 2337 3357 19719 19739 50.6 42.9 5857 19909 19885 52.5 40 1.9 191 72.9 40.3 41 51.3 2338 3358 12977 12996 50.2 40 5858 13332 13312 50.9 47.6 0.6 356 76.1 44.1 41 53.4 2339 3359 19721 19745 52.3 40 5859 19909 19885 52.5 40 0.2 189 73 40.7 41 51.9 2340 3360 17608 17627 50.2 45 5860 17769 17749 50 42.9 0.2 162 72.4 40.7 41 50.8 2341 3361 17608 17627 50.2 45 5861 18231 18210 52.2 45.5 2 624 75.2 40.1 41 52.8 2342 3362 19794 19813 50 50 5862 20099 20078 50.5 40.9 0.5 306 74.4 40.8 41 52.2 2343 3363 4658 4677 50.5 50 5863 5306 5289 50.8 50 0.3 649 75.5 40.7 41 53.1 2344 3364 24179 24200 53.3 40.9 5864 24580 24560 51.3 52.4 2 402 74.6 40 41 52.7 2345 3365 19794 19813 50 50 5865 19925 19906 50.1 50 0.1 132 72.8 43.9 41 51.1 2346 3366 1046 1064 51.2 47.4 5866 1498 1481 51 50 0.2 453 76.4 43.9 41 53.9 2347 3367 1046 1064 51.2 47.4 5867 1497 1480 50.3 50 0.9 452 76.5 44 41 53.7 2348 3368 2133 2152 50.7 45 5868 2675 2656 50.4 50 0.3 543 76.8 44.2 41 54 2349 3369 28965 28984 52.9 55 5869 29298 29279 52.6 55 0.3 334 76.4 45.2 41 54.4 2350 3370 24378 24397 55 55 5870 24564 24542 55 47.8 0 187 73.6 42.2 41 53.1 2351 3371 25348 25366 51.2 47.4 5871 25651 25632 52.7 50 1.6 304 74.7 41.4 41 52.7 2352 3372 19794 19813 50 50 5872 19923 19903 50.9 47.6 0.9 130 72.7 43.8 41 51 2353 3373 28967 28987 51.6 52.4 5873 29358 29339 52.8 50 1.2 392 76.5 44.6 41 54.1 2354 3374 17608 17627 50.2 45 5874 18233 18215 51.3 52.6 1.1 626 75.3 40.3 41 52.9 2355 3375 29186 29206 51.3 42.9 5875 29358 29339 52.8 50 1.5 173 74.5 45.1 41 52.6 2356 3376 24379 24398 55 55 5876 25093 25074 54.6 55 0.4 715 75.9 41.4 41 54.6 2357 3377 3170 3191 50.9 45.5 5877 3646 3625 52 40.9 1.1 477 75.7 41.9 41 53.4 2358 3378 3170 3191 50.9 45.5 5878 3647 3628 50.6 45 0.3 478 75.7 42.1 41 53.3 2359 3379 9140 9159 50.1 45 5879 9249 9230 51.5 45 1.4 110 71.3 42.7 41 51 2360 3380 12976 12995 51.1 45 5880 13326 13306 50.7 42.9 0.4 351 76.1 44.2 41 53.6 2361 3381 12976 12995 51.1 45 5881 13328 13307 51.2 45.5 0.1 353 76.1 44.2 41 53.7 2362 3382 3168 3189 51 45.5 5882 3494 3473 50.4 40.9 0.5 327 75.1 42.2 41 52.8 2363 3383 19794 19813 50 50 5883 19917 19896 50.9 45.5 0.9 124 72.3 43.5 41 50.7 2364 3384 24379 24398 55 55 5884 24517 24494 53.2 41.7 1.8 139 72.7 43.2 41 52 2365 3385 24380 24399 55 55 5885 25093 25074 54.6 55 0.4 714 76 41.5 41 54.6 2366 3386 2823 2844 50.4 45.5 5886 3301 3183 50.6 52.6 0.2 379 75.8 43 41 53.3 2367 3387 3798 3819 51.2 50 5887 4318 4294 54.4 40 0.2 521 75.4 41.1 41 54.2 2368 3388 9139 9159 52.5 47.6 5888 9852 9829 53.1 45.8 0.6 714 75.4 40.1 41 53.6 2369 3389 9139 9159 52.5 47.6 5889 9852 9828 53.6 44 1.1 714 75.4 40.1 41 53.6 2370 3390 19795 19814 50.4 45 5890 19927 19908 52.1 55 1.7 133 72.7 43.6 41 51.1 2371 3391 19795 19814 50.4 45 5891 19924 19905 50.1 50 0.3 130 72.4 43.1 41 50.8 2372 3392 12976 12995 51.1 45 5892 13329 13308 50.5 40.9 0.6 354 76.1 44.1 41 53.5 2373 3393 2133 2152 50 45 5893 2672 2654 50.9 52.6 0.2 540 76.8 44.3 41 54.1 2374 3394 4593 4613 51.5 47.6 5894 4836 4817 51.2 45 0.3 244 75.3 44.3 41 53.2 2375 3395 1870 1870 51.2 42.9 5895 2113 2094 50.1 45 1.1 304 75.5 43.4 41 53 2376 3396 17036 17058 53.6 47.8 5896 17483 17465 54.4 52.6 0.9 448 75.3 41 41 53.1 2377 3397 1046 1064 51.2 47.4 5897 1481 1463 50.5 47.4 0.6 436 76.2 43.6 41 53.6 2378 3398 9055 9079 52.8 40 5898 9255 9236 51.1 45 1.8 201 73.5 41.3 41 51.9 2379 3399 12976 12995 51.1 45 5899 13332 13312 50.9 47.6 0.2 357 76.2 44.3 41 53.7 2380 3400 8865 8884 50.4 45 5900 9311 9292 50.7 50 0.3 447 75.4 41.4 41 53 2381 3401 25363 25381 51.1 52.6 5901 25651 25632 52.7 50 1.6 289 74.3 40.8 41 52.5 2382 3402 3168 3189 51 45.5 5902 3504 3485 50 45 0.6 337 75.3 42.4 41 52.9 2383 3403 25363 25381 51.1 52.6 5903 25649 25629 51.5 42.9 0.3 287 74.1 40.4 41 52.3 2384 3404 29182 29202 51.2 42.9 5904 29414 29395 50.5 50 0.7 233 75.5 45.1 41 53.1 2385 3405 3031 3051 51.3 52.4 5905 3497 3478 51.3 50 0.1 467 76.3 43.5 41 53.9 2386 3406 29172 29192 51.5 42.9 590

50.4 47.4 0 553 77.9 46.8 41 54.7 2397 3417 11541 11561 50.9 42.9 5917 12110 12090 51.1 42.9 0.3 570 75.9 41.9 41 53.5 2398 3418 3360 3379 50.7 45 5918
3497 3478 51.3 50 0.6 138 74 46.4 42 52.1 2399 3419 19725 19745 50 42.9 5919 19921 19901 50.2 47.6 0.1 197 73.5 41.6 42 51.6 2400 3420 19720 19740 51.3
42.9 5920 19921 19901 50.2 47.6 1.1 202 73.4 41.1 42 51.5 2401 3421 3360 3379 50.7 45 5921 3500 3481 51.2 50 0.5 141 74 46.1 42 52.1 2402 3422 19717 19738
50.8 40.9 5922 19921 19901 50.2 47.6 0.6 205 73.4 41 42 51.5 2403 3423 24562 24580 50.1 52.6 5923 25209 25190 50.6 50 0.5 648 76.1 42 42 53.4 2404 3424
24559 24579 52 54.2 5924 24740 23752 55.6 55 5944 24022 24003 55.5 51 41.7 0.5 182 76 48.4 42 53.9 2405 3425 3360 3379 50.7 45 5925 3504 3485 50.4 45 0.3 145 74.2 46.2 42 52.2 2406
3426 19716 19737 52.2 45.5 5926 19921 19900 51.8 45.5 0.4 206 73.5 41.3 42 52.1 2407 3427 3232 3251 50.3 50 5927 3494 3473 50.4 40.9 0.1 263 74.3 41.4 42
52.2 2408 3428 26039 26058 54 55 5928 26657 26636 52.6 45.5 1.5 619 75.4 40.5 42 53.7 2409 3429 3232 3251 50.3 50 5929 3504 3485 50.4 45 0.1 273 74.6 41.8
42 52.4 2410 3430 19715 19735 52.5 47.6 5930 19921 19900 51.8 45.5 0.7 207 73.7 41.5 42 52.2 2411 3431 26039 26058 54 55 5931 26653 26631 53.2 43.5 0.9
615 75.3 40 42 53.8 2412 3432 3229 3248 50.6 50 5932 3494 3473 50.4 40 0.2 266 74.3 41.4 42 52.3 2413 3433 3229 3248 50.6 50 5933 3504 3485 50.4 45 0.3
276 74.5 41.7 42 52.4 2414 3434 3225 3244 52.4 55 5934 3495 3473 51.8 43.5 0.6 271 74.7 42.1 42 52.9 2415 3435 3222 3241 52 50 5935 3650 3631 53.1 50 1.1
429 75.5 42 42 53.6 2416 3436 24559 24579 52 52.4 5936 25209 25190 50.6 50 1.3 651 76.1 42.1 42 53.6 2417 3437 6158 6178 51.3 42.9 5937 6289 6267 52.2
43.5 0.9 132 71.3 40.2 42 50.4

2418 3438 19709 19730 51.3 40.9 5938 19917 19896 50.9 45.5 0.3 209 73.7 41.6 42 52 2419 3439 3223 3241 50.2 52.6 5939 3497 3478 51.3 50 1.1 275 74.7 42.2
42 52.5 2420 3440 3223 3241 50.2 52.6 5940 3646 3625 52 40.9 1.8 424 75.4 41.7 42 53 2421 3441 3223 3241 50.2 52.6 5941 3647 3628 50.6 45 0.4 425 75.5 41.9
42 53 2422 3442 3217 3237 51.8 47.6 5942 3650 3631 53.1 50 1.3 434 75.5 41.9 42 53.5 2423 3443 9352 9372 51.3 42.9 5943 10014 9996 50.7 52.6 0.6 663 75.6
40.7 42 53.2 2424 3444 23733 23752 55.6 55 5944 24022 24003 55.5 51 1.1 290 74.5 41.4 42 53.9 2425 3445 26040 26061 56.4 54.5 5945 26661 26639 55.3 47.8
1.2 622 75.5 40.7 42 54.5 2426 3446 9918 9938 51.4 47.6 5946 10608 10589 51 50 0.4 691 75.8 41.1 42 53.4 2427 3447 7724 7742 51.4 52.6 5947 7843 7825 52.8
52.6 1.3 120 70.7 40 42 50 2428 3448 26040 26061 56.4 54.5 5948 26655 26631 56.2 48 0.2 616 75.4 40.6 42 54.8 2429 3449 28117 28135 50.6 52.6 5949 28506
28488 50.2 47.4 0.4 390 79.4 51.8 42 55.8 2430 3450 3187 3236 51.1 50 5950 3497 3478 51.3 50 0.2 281 74.7 42 42 52.7 2431 3451 3217 3236 51.1 50 5951 3500
3481 51.2 50 0.1 284 74.7 41.9 42 52.7 2432 3452 3165 3187 51.6 43.5 5952 3650 3631 53.1 50 1.5 486 75.8 42.2 42 53.6 2433 3453 19709 19730 51.3 40.9 5953
19925 19906 50.1 50 1.2 217 74 41.9 42 51.9 2434 3454 9927 9945 50.8 52.6 5954 10199 10180 51.5 45 0.7 273 75.3 43.6 42 53.1 2435 3455 9929 9946 50 50
5955 10670 10649 51.3 40.9 1.3 742 75.7 40.8 42 53.1 2436 3456 19709 19730 51.3 40.9 5956 19927 19908 52.1 55 0.9 219 74 42 42 52.3 2437 3457 9934 9953
50.7 50 5957 10356 10336 52.4 47.6 1.7 423 75.6 42.1 42 53.2 2438 3458 19709 19730 51.3 40.9 5958 19930 19910 50.6 47.6 0.7 222 74 41.9 42 52.1 2439 3459
3164 3186 51.6 43.5 5959 3650 3631 53.1 50 1.5 487 75.9 42.3 42 53.7 2440 3460 3089 3110 51.8 45.5 5960 3188 3166 51.6 43.5 0.2 100 72 46 42 51 2441 3461
18979 19000 51.6 45.5 5961 19215 19194 50.2 40.9 1.4 237 73.5 40.1 42 51.6 2442 3462 26421 26441 51.5 42.9 5962 26900 26882 51.5 52.6 0.1 480 77.5 46.2 42
54.8 2443 3463 26421 26441 51.5 42.9 5963 26828 26810 52.9 52.6 1.4 408 76.6 44.9 42 54.2 2444 3464 11540 11557 50.4 50 5964 11826 11802 51.3 40 0.8 287
74.4 41.1 42 52.3 2445 3465 26421 26441 51.5 42.9 5965 26695 26678 50.5 50 1 275 74.9 42.5 42 52.7 2446 3466 11540 11557 50.4 50 5966 11819 11798 50.3
40.9 0.1 280 74.3 41.1 42 52.2 2447 3466 11540 11557 50.4 50 5967 11817 11797 50.4 42.9 0.1 278 74.3 41 42 52.2 2448 3468 23841 23859 50.5 52.6 5968 24515
24494 50.4 40.9 0.1 675 76.1 41.9 42 53.5 2449 3469 3055 3077 52.8 43.5 5969 3495 3473 51.8 43.5 0.9 441 76 43.1 42 53.9 2450 3470 3795 3813 52.1 52.6 5970
4565 4542 53.9 41.7 1.8 771 75.6 40.3 42 53.6 2451 3471 11540 11560 53.2 47.6 5971 11984 11966 53 52.6 0.2 445 75.1 40.7 42 53.6 2452 3472 11541 11561 50.9
42.9 5972 12165 12147 51.2 47.4 0.4 625 75.7 41.3 42 53.4 2453 3473 3795 3815 54.6 52.4 5973 4318 4294 54.4 40 0.2 524 75.5 41.2 42 54.3 2454 3474 7723
7741 52.2 52.6 5974 7853 7833 50.7 47.6 1.5 131 71.3 40.5 42 50.2 2455 3475 3055 3075 51.8 47.6 5975 3504 3485 50.4 45 1.4 450 76.1 43.1 42 53.5 2456 3476
3055 3074 51.1 50 5976 3494 3473 50.4 40.9 0.7 440 76 43 42 53.4 2457 3477 26421 26441 51.5 42.9 5977 26651 26631 50.2 42.9 1.3 231 73.8 41.1 42 51.8 2458
3478 28109 28130 50.2 40.9 5978 28672 28654 50.6 52.6 0.4 564 79.9 51.6 42 56.1 2459 3479 3055 3074 51.1 50 5979 3504 3485 50.4 45 0.7 450 76.1 43.1 42
53.5 2460 3480 12232 12250 51.9 52.6 5980 12412 12392 50 42.9 1.9 181 73.2 41.4 42 51.3 2461 3481 3034 3053 50.3 50 5981 3210 3190 50.5 47.6 0.2 177 74.9
45.8 42 52.6 2462 3482 3034 3053 50.3 50 5982 3494 3473 50.4 40.9 0.1 461 76.1 43.2 42 53.5 2463 3483 3034 3053 50.3 50 5983 3504 3485 50.4 45 0.1 471 76.2
43.3 42 53.5 2464 3484 12236 12256 51.2 42.9 5984 12498 12480 50 47.4 1.1 263 74.6 42.2 42 52.4 2465 3485 12352 12375 52.9 41.7 5985 12724 12705 52.4 55
0.5 373 75.7 42.9 42 53.8 2466 3486 26421 26441 51.5 42.9 5986 26585 26567 51 47.4 0.5 165 72.2 40 42 50.9 2467 3487 3031 3051 51.3 52.4 5987 3503 3484
51.5 50 0.1 473 76.3 43.6 42 53.9 2468 3488 18704 18724 50.8 47.6 5988 19480 19459 50.3 40.9 0.4 777 75.5 40.2 42 53.1 2469 3489 3016 3036 50.2 42.9 5989
3646 3625 52 40.9 1.8 631 76.4 42.8 42 53.6 2470 3490 2823 2844 50.4 45 0.5 5990 3053 3034 50.3 50 0.2 231 74 41.6 42 52 2471 3491 12366 12384 51.7 52.6
5991 12994 12976 50.3 47.4 1.3 629 76.4 42.9 42 53.7 2472 3492 12366 12384 51.7 52.6 5992 12992 12974 51.2 52.6 0.5 627 76.5 43.1 42 54 2473 3493 2823
2844 50.4 45.5 5993 3056 3037 52.1 55 1.6 234 74.2 41.9 42 52.2 2474 3494 2522 2541 51.4 45 5994 2672 2654 50.9 52.6 0.5 151 75.3 48.3 42 53 2475 3495 2522
2541 51.4 45 5995 2675 2656 50.4 50 1 154 75.2 48.1 42 52.9 2476 3496 2429 2447 50.2 47.4 5996 3056 3037 52.1 55 1.9 628 76.3 42.7 42 53.6 2477 3497 2429
2447 50.2 47.4 5997 3190 3169 50.7 45 0.5 762 76.6 42.9 42 53.8 2478 3498 27436 27455 52.7 45 5998 27541 27521 51.7 47.6 1 106 72.1 45.3 42 51.1 2479
3499 2429 2447 50.2 47.4 5999 3192 3171 51.9 50 1.7 764 76.7 43.1 42 53.8 2480 3500 2427 2445 52.1 52.6 6000 3056 3037 52.1 55 0 630 76.4 42.9 42 54.2 2481
3501 27389 27407 50.6 47.4 6001 27541 27521 51.7 47.6 1.1 153 73.2 43.1 42 51.5 2482 3502 2427 2445 52.1 52.6 6002 3190 3169 50.7 45.5 1.4 764 76.7 43.1 42
54 2483 3503 18616 18636 51.4 47.6 6003 19316 19295 50 40.9 1 701 75.4 40.2 42 52.9 2484 3504 2377 2395 52.4 52.6 6004 2672 2653 51.6 50 0.8 296 77 47.3
42 54.5 2485 3505 18591 18611 51.7 42.9 6005 19216 19195 50.2 40.9 1.4 626 75.7 41.1 42 53.1 2486 3506 12366 12384 51.7 52.6 6006 12739 12718 51 40.9 0.7
374 75.6 42.8 42 53.3 2487 3507 2377 2395 52.4 52.6 6007 2672 2654 50.9 52.6 1.5 296 77 47.3 42 54.3 2488 3508 16982 17001 51.2 55 6008 17111 17090 51.1
40.9 0.1 130 74.6 48.5 42 52.6 2489 3509 2377 2395 52.4 52.6 6009 2675 2656 50.4 50 2 299 77 47.2 42 54.1 2490 3510 18590 18608 50.6 42.1 6010 19216 19195
50.2 40.9 0.3 627 75.6 41 42 53.1 2491 3511 2377 2395 52.4 52.6 6011 2891 2873 50.8 47.4 1.6 515 76.8 44.5 42 54.1 2492 3512 8220 8240 54 47.6 6012 8935
8917 54.5 52.6 0.4 716 75.4 40.1 42 54.1 2493 3513 12370 12388 50.1 47.4 6013 12998 12979 50.1 45 0.1 629 76.4 42.9 42 53.6 2494 3514 2223 2244 51.4 45.5
6014 2675 2656 50.4 50 1 453 77 45.3 42 54.1 2495 3515 2220 2239 51.3 45 6015 2672 2654 50.9 52.6 0.4 453 77 45.3 42 54.2 2496 3516 24418 24439 52.9 45.5
6016 24936 24919 51.8 50 1.1 519 76 42.4 42 53.8 2497 3517 18586 18603 50.4 44.4 6017 19216 19195 50.2 40.9 0.2 631 75.6 40.9 42 53.1 2498 3518 2220 2239
51.3 45 6018 2675 2656 50.4 50 0.8 456 76.9 45.2 42 54.1 2499 3519 1402 1422 50.2 42.9 6019 2153 2134 50.4 45 0.2 752 76.7 43.1 42 53.8 2500 3520 1356 1375
53.8 55 6020 2153 2133 52.1 42.9 1.7 798 76.9 43.5 42 54.5

[1664] ТАБЛИЦА US-00069 Таблица 5 Грунтотып Т. sub.M Продукт Передний праймер SEQ обратный праймер SEQ (длина ID NO & Co-ordinates ID NO & Co-ordinates (степень С.) (bp) 6076 1-19 6171 199-183 50.1 50.3 199 6077 149-169 6172 334-315 51.5 52.4 186 6078 292-310 6173 560-541
50.8 51.1 269 6079 598-619 6174 749-731 52.6 50.6 152 6080 721-742 6175 930-912 50.4 50.3 210 6081 888-912 6176 1077-1058 52.8 51.2 190 6082 984-1003
6177 1149-1131 51.1 51.1 166 6083 1157-1175 6178 1479-1460 50.9 51.6 323 6084 1420-1441 6179 1700-1680 51.2 50.7 281 6085 1685-1707 6180 1834-1811
53.8 53.7 150 6086 1740-1764 6181 1987-1963 53.4 52.2 248 6087 2007-2025 6182 2251-2232 50.3 50.1 245 6088 2226-2245 6183 2385-2366 50.4 50.1 160 6089
2428-2446 6184 2749-2728 50.1 50.3 322 6090 2742-2763 6185 2893-2875 50.6 51.4 152 6091 2823-2844 6186 3082-3058 50.4 52.3 260 6092 3007-3031 6187
3185-3164 51.9 51.0 179 6093 3234-3254 6188 3497-3478 51.1 51.3 264 6094 3453-3476 6189 3647-3627 51.8 52.1 195 6095 3601-3622 6190 3877-3853 51.5
53.6 277 6096 4007-4027 6191 4158-4135 51.1 51.4 152 6097 4141-4165 6192 4316-4295 51.3 50.8 176 6098 4366-4387 6193 4567-4544 54.6 55.4 202 6099
4488-4508 6194 4708-4690 50.7 50.3 221 6100 4658-4677 6195 4994-4974 50.5 51.2 337 6101 4902-4922 6196 5115-5092 50.5 51.4 214 6102 5239-5260 6197
5450-5430 50.8 50.9 212 6103 5366-5389 6198 5560-5542 50.5 51.8 195 6104 5593-5612 6199 5860-5836 50.8 51.6 268 6105 6042-6062 6200 6291-6271 50.4
51.1 250 6106 6271-6291 6201 6483-6463 51.1 50.2 213 6107 7017-7040 6202 7171-7153 52.4 52.8 155 6108 7253-7272 6203 7504-7486 50.3 50.3 252 6109
7415-7434 6204 7677-7654 54.5 53.6 263 6110 7615-7635 6205 7821-7798 51.1 52.8 207 6111 7728-7746 6206 7936-7915 51.7 50.1 209 6112 7845-7867 6207
7994-7970 52.7 53.4 150 6113 8011-8029 6208 8189-8170 51.4 50.6 179 6114 8143-8166 6209 8300-8281 52.2 50.8 158 6115 8221-8239 6210 8388-8369 51.0
51.1 168 6116 8553-8575 6111 8931-8915 51.8 50.3 379 6117 8867-8886 6112 9254-9236 50.7 50.6 388 6118 9244-9267 6213 9597-9573 51.9 53.4 354 6119
9620-9640 6214 9990-9969 51.3 51.3 371 6120 10009-10027 6215 10188-10171 50.2 50.2 180 6121 10093-10113 6216 10244-10223 52.4 50.6 152 6122 10242-
10265 6217 10608-10589 51.2 51.0 367 6123 10549-10571 6218 10783-10763 53.7 55.2 235 6124 10766-10785 6219 10930-10912 52.0 51.1 165 6125 11065-
11085 6220 11305-11287 50.7 50.0 241 6126 11265-11287 6221 11429-11405 54.5 53.5 165 6127 11552-11571 6222 11730-11709 52.0 50.4 179 6128 11705-
11726 6223 11869-11848 50.1 50.2 165 6129 11801-11824 6224 11984-11967 51.5 50.4 184 6130 12040-12058 6225 12254-12235 52.3 51.9 215 6131 12235-
12253 6226 12406-12388 50.1 50.1 172 6132 12366-12384 6227 12730-12712 51.7 52.2 365 6133 12727-12748 6228 12994-12976 50.8 50.3 268 6134 12948-
12966 6229 13224-13201 50.7 51.7 277 6135 13175-13196 6230 13324-13300 54.3 55.1 150 6136 13237-13258 6231 13545-13526 52.9 52.9 309 6137 13790-
13810 6232 13963-13945 50.9 50.7 174 6138 14080-14098 6233 14280-14257 51.5 51.0 201 6139 14405-14427 6234 14561-14540 50.2 50.9 157 6140 14882-
14906 6235 15046-15024 50.9 51.5 165 6141 14951-14976 6236 15145-15124 53.1 52.9 195 6142 15113-15134 6237 15275-15257 51.6 50.8 163 6143 15211-
15230 6238 15383-15363 50.2 50.1 173 6144 15364-15387 6239 15528-15506 54.0 52.1 165 6145 15456-15477 6240 15605-15585 52.0 53.2 150 6146 15513-
15532 6241 15897-15876 51.2 50.4 385 6147 15837-15856 6242 15999-15978 52.3 50.8 163 6148 16073-16096 6243 16301-16277 51.7 52.8 229 6149 16245-
16266 6244 16404-16380 50.3 52.0 160 6150 16366-16385 6245 16515-16492 52.9 53.8 150 6151 16553-16571 6246 16777-16758 53.4 51.5 225 6152 16832-
16852 6247 17026-17004 51.0 51.6 195 6153 16982-17001 6248 17359-17340 51.2 50.2 378 6154 17354-17372 6249 17511-17490 51.3 50.4 158 6155 17422-
17443 6250 17573-17552 50.2 51.1 152 6156 17603-17623 6251 17769-17748 50.7 51.5 167 6157 17728-17

18981 6259 19109-19085 54.7 54.3 150 6165 19065-19089 6260 19217-19195 52.8 51.7 153 6166 19310-19329 6261 19476-19454 50.2 52.1 167 6167 19569-19589 6262 19719-19701 50.5 51.8 151 6168 19707-19731 6263 19856-19833 55.7 55.9 150 6169 19771-19792 6264 19921-19901 50.1 50.2 151 6170 19833-19851 6265 19986-19966 50.9 50.7 154

[1665] ТАБЛИЦА-США-00070 Таблица 6 Грунтовки Т. sub.M Продукт Передний праймер SEQ обратный праймер SEQ (для & REV) длина ID NO & Co-ordinates ID NO & Co-ordinates (.степень. С.) (bp) 6266 20110-20132 6305 20425-20404 51.9 50.9 316 6267 20468-20492 6306 20617-20596 53.2 53.5 150 6268 20557-20578 6307 20891-20871 50.4 50.6 335 6269 20838-20856 6308 21037-21015 52.5 52.0 200 6270 21096-21116 6309 21295-21272 50.1 51.7 200 6271 22173-22194 6310 22414-22395 52.4 51.0 242 6272 22320-22342 6311 22501-22479 54.8 54.3 182 6273 22532-22552 6312 22695-22675 50.6 50.0 164 6274 22712-22736 6313 22873-22852 56.7 55.5 162 6275 22842-22861 6314 23086-23067 51.0 52.8 245 6276 23151-23170 6315 23395-23376 51.4 50.3 245 6277 23307-23326 6316 23524-23501 51.1 51.1 218 6278 23615-23635 6317 23776-23758 50.7 50.2 162 6279 23838-23857 6318 23996-23977 50.4 50.6 159 6280 24030-24051 6319 24407-24386 57.6 55.7 378 6281 24388-24407 6320 24581-24563 50.4 50.1 194 6282 24559-24579 6321 24938-24921 52.0 50.4 380 6283 24922-24941 6322 25184-25166 50.1 51.2 263 6284 25201-25220 6323 25400-25382 51.1 51.4 200 6285 25363-25381 6324 25646-25627 51.1 50.5 284 6286 25656-25681 6325 25839-25814 54.5 55.6 184 6287 25761-25782 6326 25982-25961 54.6 54.3 222 6288 26039-26058 6327 26189-26166 54.0 53.0 151 6289 26184-26205 6328 26333-26310 50.9 51.8 150 6290 26422-26442 6329 26660-26641 51.3 50.2 239 6291 26571-26589 6330 26739-26715 51.7 53.2 169 6292 26733-26752 6331 26960-26941 51.1 52.2 228 6293 26866-26885 6332 27139-27117 50.7 51.9 274 6294 27300-27321 6333 27458-27439 51.2 50.2 159 6295 27361-27380 6334 27579-27558 52.4 51.1 219 6296 27718-27740 6335 27917-27901 50.7 50.0 200 6297 28041-28059 6336 28207-28189 50.8 50.8 167 6298 28166-28189 6337 28411-28393 52.2 52.9 246 6299 28395-28414 6338 28671-28653 51.5 50.2 277 6300 28654-28672 6339 28821-28800 50.6 52.3 168 6301 28867-28885 6340 29184-29166 51.5 51.6 318 6302 29183-29204 6341 29360-29342 50.4 50.4 178 6303 29262-29279 6342 29626-29606 50.1 50.2 365 6304 29538-29559 6343 29690-29670 50.0 50.4 153

[1666] ТАБЛИЦА-США-00071 Таблица 7 Грунтовки Имя SEQ ID NO: координаты AB4f 6344 19869-19888 AB5f 6345 20238-20257 BC1f 6346 20581-20600 BC2f 6347 20950-20969 BC3f 6348 21339-21358 BC4f 6349 21708-21727 BC5f 6350 22041-22060 BC6f 6351 22410-22429 BC7f 6352 22759-22778 BC8f 6353 23131-23150 BC9f 6354 23500-23519 BC10f 6355 23841-23860 BC11f 6356 24210-24229 BC12f 6357 24560-24579 BC13f 6358 24941-24960 BC14f 6359 25310-25329 BC15f 6360 25675-25694 BC16f 6361 26044-26063 BC17f 6362 26413-26432 BC18f 6363 26763-26782 BC19f 6364 27132-27151 BC20f 6365 27491-27510 BC21f 6366 27845-27864 CB1r 6367 28011-28030 CB2r 6368 27671-27690 CB3r 6369 27301-27320 CB4r 6370 26931-26950 CB5r 6371 26575-26594 CB6r 6372 26191-26210 CB7r 6373 25841-25860 CB8r 6374 25476-25495 CB9r 6375 25126-25145 CB10r 6376 24791-24810 CB11r 6377 24422-24441 CB12r 6378 24031-24050 CB13r 6379 23673-23692 CB14r 6380 23298-23317 CB15r 6381 22928-22947 CB16r 6382 22567-22586 CB17r 6383 22196-22215 CB18r 6384 21831-21850 CB19r 6385 21431-21450 CB20r 6386 21073-21092 CB21r 6387 20715-20734 BA1r 6388 20345-20364 BA2r 6389 19969-19988 BA3r 6390 19599-19618 BA4r 6391 19228-19247 BA5r 6392 18852-18871

[1667] ТАБЛИЦА-США-00072 Таблица 8 Грунтовки Имя SEQ ID нет координат F1 6393 1-19 F2 6394 292-310 F3 6395 721-742 F4 6396 984-1003 F5 6397 1420-1441 F6 6398 1740-1764 F7 6399 2226-2245 F8 6400 2742-2763 F9 6401 3007-3031 F10 6402 3453-3476 F11 6403 4007-4027 F12 6404 4366-4387 F13 6405 4658-4677 F14 6406 5239-5260 F15 6407 5593-5612 F16 6408 6271-6291 F17 6409 7253-7272 F18 6410 7615-7635 F19 6411 7845-7867 F20 6412 8143-8166 F21 6413 8553-8575 F22 6414 9244-9267 F23 6415 10009-10027 F24 6416 10242-10265 F25 6417 10766-10785 F26 6418 11265-11287 F27 6419 11705-11726 F28 6420 12040-12058 F29 6421 12366-12384 F30 6422 12948-12966 F31 6423 13237-13258 F32 6424 14080-14098 F33 6425 14882-14906 F34 6426 15113-15134 F35 6427 15364-15387 F36 6428 15513-15532 F37 6429 16073-16096 F38 6430 16366-16385 F39 6431 16832-16852 F40 6432 17354-17372 F41 6433 17603-17623 F42 6434 18011-18030 F43 6435 18270-18292 F44 6436 18550-18571 F45 6437 18960-18981 F46 6438 19310-19329 F47 6439 19707-19731 F48 6440 19833-19851 R1 6441 334-315 R2 6442 749-731 R3 6443 1077-1058 R4 6444 1479-1460 R5 6445 1834-1811 R6 6446 2251-2232 R7 6447 2749-2728 R8 6448 3082-3058 R9 6449 3497-3478 R10 6450 3877-3853 R11 6451 4316-4295 R12 6452 4708-4690 R13 6453 5115-5092 R14 6454 5560-5542 R15 6455 6291-6271 R16 6456 7171-7153 R17 6457 7677-7654 R18 6458 7936-7915 R19 6459 8189-8170 R20 6460 8388-8369 R21 6461 9254-9236 R22 6462 9990-9969 R23 6463 10244-10223 R24 6464 10783-10763 R25 6465 11305-11287 R26 6466 11730-11709 R27 6467 11984-11967 R28 6468 12406-12388 R29 6469 12994-12976 R30 6470 13324-13300 R31 6471 13963-13945 R32 6472 14561-14540 R33 6473 15145-15124 R34 6474 15383-15363 R35 6475 15605-15585 R36 6476 15999-15978 R37 6477 16404-16380 R38 6478 16777-16758 R39 6479 17359-17340 R40 6480 17573-17552 R41 6481 17883-17862 R42 6482 18225-18205 R43 6483 18648-18629 R44 6484 19004-18983 R45 6485 19217-19195 R46 6486 19719-19701 R47 6487 19921-19901

[1668] ТАБЛИЦА-US-00073 Таблица 9 Грунтовки Имя SEQ ID нет: 1 CB12R 6488 2 R0010 6489 3 R0011 6490 4 R0012 6491 5 BNI-ED 6492 6 BNI-EU 6493 7 SAR1S-U 6494 8 SAR1As-D 6495 9 SAR1S 6496 10 SAR1As 6497 11 IN2-U 6498 12 IN4-D 6499 13 IN-2 6500 14 IN-4 6501 15 v-6 6502 16 IN-7 6503 17 COR1-U 6504 18 COR2-D 6505 19 KOP - 1 6506 20 KOP-2 6507 21 HKUF-U 6508 22 HKUR-D 6509 23 HKU-F 6510 24 ГКУ-Р 6511 25 1451-D 6512 26 1451-U 6513 27 690-D 6514 28 690-U 6515 29 690-D2 6516 30 690-U2 6517 31 EMC7-U 6518 32 EMC7-U 6519 33 EMC7-D2 6520 34 EMC7-U2 6521 35 EMC8-D 6522 36 EMC8-U 6523 37 EMC8-D2 6524 38 EMC8-U2 6525 39 EMC11-D 6526 40 EMC11-U 6527 41 ORF1B-D 6528 42 ORF1B-U 6529 43 ORFS-D 6530 44 РУДЫ-U 6531 45 E7-717F 6532 46 E8-85R 6533 47 E8-307F 6534 48 E11-771F 6535 49 E11-96P 6536 50 CON1-F 6537 51 CON1-U 6538 52 CON2-F 6539 53 CON2-R 6540 54 CON3-F 6541 55 CON3-R 6542 56 15-F 6543 57 15-p 6544 58 15-F2 6545 59 15-R2 6546 60 13-F 6547 61 13-R 6548 62 13-F2 6549 63 13-R2 6550 64 CONTIG-F 6551 65 QT3-R 6552 66 QT3-F 6553 67 ЦИНЬ-Р 6554 68 ЦИНЬ-Ф 6555 69 AB1-F 6556 70 AB2-F 6557 71 AB3-F 6558 72 AB1-R 6559

[1669] ТАБЛИЦА-США-00074 Таблица 10 Особенности прогнозируемых белков и открытых рамок считывания при ОРВИ вирус Спайность длины ОРФ SARS (SEQ ID NO) (aa) ролевые функции сайта минус.отхлебывать.д* ORF1a P28 (9766) 179 лидер белка 179 (г/г).отхлебывать.# + P65 (9767) 639 гомолог MHV p65 818 (G/A) + продукт для расщепления кожи Nsp1 2422.отхлебывать.## Папаин как протеаза, 3240 (Q/S) фосфотерезный домен + (9768) расщепляет первые два домена привязки Zn белковая пища Nsp2 306 3С-подобная протеаза, расщепляет 3546 (Q/G) + (9769) белки nsp1-nsp12 Nsp3 (9770) 290 ? 3836 (Q/S) 5 TMDs + Nsp4 (9771) 83 ? 3919 (Q/A) 1 TMD + Nsp5 (9772) 198 ? 4117 (Q/N) + Nsp6 (9773) 113 ? 4230 (Q / A) + Nsp7 (9774) 139 ? 4369 (Q/S) предполагаемый фактор роста-подобный мотив + ORF1b nsp9 (9775) 932 РНК-полимераза 5298 (Q/A) + Nsp10 (9776) 601 предполагаемый домен связывания металла helicase 5899 (Q/A), + Tanner et al. (2003) J Biol Chem ATP/GTP binding domain 278: 39578-82 Nsp11 (9777) 527 ? 6426 (Q/S) + Nsp12 (9778) 346 ? 6772 (Q / A) + Nsp13 (9779) 298 ? -- + Пептид руководителя структурного шипа главный антигенный, 1 TMD, 17 N - + область (6042) детерминанта, содержащая участки гликозилирования рецептор-связывающий домен Orf3 (6043) 274 ? 2 TMDs, 1 место Н-гликозилирования, 10 - Сайты о-гликозилирования Orf4 (6044) 154 ? - Конверт (e) 76 ассоциированный с вирусными 1 TMD, 2 n-участками гликозилирования + (6045) конверт Матрикс (M) 221, ассоциированный с вирусными 3 TMDs, 1 N-сайт гликозилирования + (6046) оболочка, мембрана охватывающий белок Orf7 63 ? 1 TMD - (6047) Orf8 (6048) 122 ? 1 TMD - Orf9 (6049) 44 ? Поверхност-связанный - Orf10 39 ? Поверхност-связанный - Orf11 (6050) 84 ? 1-n-участок гликозилирования - Нуклеокапсид (N) 422, ассоциированный с вирусным фосфопротеином + (6052) геномная РНК Orf13 98 ? 1 o-участок гликозилирования - TMD: предсказанный трансмембранный домен. Аферы.отхлебывать.д.* + указывает на наличие соответствующего белка по крайней мере в один из других коронавирусов .отхлебывать.#Альтернативно, расщепленный после Gly-Gly (т. е. при G/A), чтобы дать 180mer .отхлебывать.##Этот 2422mer может быть дополнительно расщеплен после остатка 1922 (Gly-2740 SEQ ID NO: 6039), чтобы дать 1922mer PLpro, содержащий ZN-привязку мотив (SEQ ID NO: 7254) и 500mer.

[1670] ТАБЛИЦА-US-00075 Таблица 11 Белковые гомологии между торс и другими коронавирусами группа 1 Группа 2 группа 3 Белки 229E TGV PEDV MHV VCoV AIVV РЕГИОН РЕПЛИКАЗЫ белок лидер <20 <20 <20 27 <20 p28 p65 гомолог <20 23 23 <20 20 nsp1 25.5 25.8 25.4 29 30 25 (PLP протеаза) nsp2 40.4 43.8 44.6 50 48.4 41 (Протеаза 3CL) nsp3 30 27 29.4 34.2 35.5 28.5 67.4 38.6 42.2 39.8 47.5 46.1 37.3 nsp5 48.2 42.9 43.9 46.8 47.3 38.7 nsp6 45.1 38.9 45.1 45.1 46.9 39.8 nsp7 53.8 54.5 56.1 56.2 55.4 58.3 nsp9 59.8 59.6 60 67.3 66.9 62.4 (полимеразный) nsp10 60.7 62 62.3 67.2 68.6 58.9 (геликаза) nsp11 52.3 53.7 52.3 57.6 57.6 52 nsp12 44.1 43 45.4 45.9 45 40.2 nsp13 56.4 54.4 55.3 63 65 53.4 СТРУКТУРНЫЙ РЕГИОН Спайк (Ы) 28.8 31.6* 30.3 31.1 31 32.7* Конверт (E) 33* 27.9 20 23 26.5 23.2 Матрица 30.6 32.5 34.8 40.8 41.9 32.5 гликопротеин (M) Нуклеокапсид 26.9 30.1 29.5 37.3 37.4 31.5 (Северный) *Эти три выравнивания были получены только на фрагменте целого белок. Цифры указывают процент аминокислотной идентичности между белками SARS и соответствующие генные продукты других коронавирусов. Более консервативный пары выделены жирным шрифтом; другие переменные пары выделены подчеркиванием.

[1671] ТАБЛИЦА-США-00076 Таблица 12 Нуклеотидные и аминокислотные различия между пятью изолятами SARS FRA * TOR2 * Urbani* CUNK* НКУ* позиция.степень. основа / аминокислотная основа / аминокислотная основа / аминокислота основание / аминокислота основание / аминокислота ORF1a 2557 A / Thr G / Ala G / Ala G / Ala G / Ala 2601 T / Val C 7746 G / Pro T 7919 C / Ala T / Val 7930 G / Asp A / Asn 8387 G / Ser C / Thr 8416 G / Arg C / Thr 9404 T / Val C / Ala 9479 T / Val C / Ala 11448 T / Ile C C C C ORF1b 13494 GT / Val AG / Ser 16622 C / Ala T 17564 T / Asp C / Glu 17846 C / Arg T 18065 G / L A 18965 A / Ile T T T T 19064 A / Glu G G 19084 T / Ile C / Thr C / Thr C / Thr C / Thr C / Thr шип 21721 G / Gly A / Asp 22222 T / Ile C / Thr 23220

T / Ser G / Ala 24872 T / Лей C 24933 T / Phe C / Leu C / Leu C / Leu C / Leu ORF3 25298 G / Gly A / Arg 25569 T / Met A / Lys матрица 26600 T / Val C / Ala C / Ala C / Ala 26857 T / Ser C / Pro ORF10 27827 T / Cys C / Arg нуклеокапсид 28268 T / Ile C / Thr C / Thr C/Thr C / Thr * Атипичная коронавирусная Фра (присоединительный номер AY310120) Коронавирус торс TOR2 (присоединительный номер AY274119) Коронавирус атипичной пневмонии Urbani (регистрационный номер AY278741) Коронавирус торс CUNH-W1 (присоединительный номер AY278554) Коронавирус торс ГКУ-39849 (присоединительный номер AY278491) .степень.Позиция основана на последовательности FRA.

[1672] таблицы 13-25: предсказания Т-эпитопа для SEQ ID NOS: 6039-6050 & 6052

[1673] предсказания Эпитопа были выполнены на <http://www.mpiib-berlin.mpg.de/MAPPP/binding.html> использование минимального балла 0,5 и матрицы BIMAS, с максимумом 20 будучи выбранными результатов. В результате анализа было выявлено 9 мер и 10 мерных эпитопов. ТАБЛИЦА-US-00077 Таблица 13 Эпитопы для SEQ ID нет: 6039 Начало % от макс. Ранг позиция последовательность оценка оценка HLA A1-9 mers Максимально возможная оценка с использованием этой молекулы типа 5625 1 1867 SEQ ID NO: 7400 8% 450 2 4139 SEQ ID NO: 7401 5.55% 312.5 3 88 SEQ ID NO: 7402 4% 225 4 4249 SEQ ID NO: 7403 3.55% 200 5 4059 SEQ ID NO: 7404 2.22% 125 6 2027 SEQ ID NO: 7405 1.6% 90 7 3413 SEQ ID NO: 7406 1.11% 62.5 8 1823 SEQ ID NO: 7407 0.88% 50 9 2798 SEQ ID NO: 7408 0.88% 50 10 220 SEQ ID NO: 7409 0.8% 45 11 3738 SEQ ID NO: 7410 0.8% 45 12 4182 SEQ ID NO: 7411 0.8% 45 13 4174 SEQ ID NO: 7412 0.66% 37.5 14 1940 SEQ ID NO: 7413 0.55% 31.25 15 38 SEQ ID NO: 7414 0.48% 27 16 1231 SEQ ID NO: 7415 0.44% 25 17 1613 SEQ ID NO: 7416 0.44% 25 18 3645 SEQ ID NO: 7417 0.44% 25 19 4192 SEQ ID NO: 7418 0.44% 25 20 378 SEQ ID NO: 7419 0.4% 22.5 HLA A1-10 mers Максимально возможная оценка с использованием этой молекулы типа 5625 1 1867 SEQ ID NO: 7420 8% 450 2 1495 SEQ ID NO: 7421 4% 225 3 3921 SEQ ID NO: 7422 2.4% 135 4 486 SEQ ID NO: 7423 2.22% 125 5 4139 SEQ ID NO: 7424 2.22% 125 6 62 SEQ ID NO: 7425 1.6% 90 7 1190 SEQ ID NO: 7426 1.6% 90 8 1284 SEQ ID NO: 7427 1.6% 90 9 3284 SEQ ID NO: 7428 1.6% 90 10 2921 SEQ ID NO: 7429 1.2% 67.5 11 349 SEQ ID NO: 7430 0.8% 45 12 789 SEQ ID NO: 7431 0.8% 45 13 1185 SEQ ID NO: 7432 0.8% 45 14 4184 SEQ ID NO: 7433 0.8% 45 15 1313 SEQ ID NO: 7434 0.64% 36 16 3948 SEQ ID NO: 7435 0.48% 27 17 149 SEQ ID NO: 7436 0.44% 25 18 941 SEQ ID NO: 7437 0.44% 25 19 1390 SEQ ID NO: 7438 0.44% 25 20 1613 SEQ ID NO: 7439 0.44% 25 HLA A3-9 mers Максимально возможная оценка с использованием этой молекулы типа 12150 1 1010 SEQ ID NO: 7440 1.48% 180 2 3155 SEQ ID NO: 7441 1.48% 180 3 1229 SEQ ID NO: 7442 1.23% 150 4 2405 SEQ ID NO: 7443 0.88% 108 5 2 SEQ ID NO: 7444 0.74% 90 6 2304 SEQ ID NO: 7445 0.74% 90 7 2358 SEQ ID NO: 7446 0.74% 90 8 3160 SEQ ID NO: 7447 0.74% 90 9 3771 SEQ ID NO: 7448 0.74% 90 10 4007 SEQ ID NO: 7449 0.74% 90 11 3079 SEQ ID NO: 7450 0.66% 81 12 4045 SEQ ID NO: 7451 0.66% 81 13 1081 SEQ ID NO: 7452 0.49% 60 14 3268 SEQ ID NO: 7453 0.49% 60 15 4144 SEQ ID NO: 7454 0.49% 60 16 614 SEQ ID NO: 7455 0.37% 45 17 728 SEQ ID NO: 7456 0.37% 45 18 1537 SEQ ID NO: 7457 0.37% 45 19 313 SEQ ID NO: 7458 0.32% 40 20 1744 SEQ ID NO: 7459 0.32% 40 HLA A3-10 mers Максимально возможная оценка с использованием этой молекулы типа 12150 1 62 SEQ ID NO: 7460 4.44% 540 2 2151 SEQ ID NO: 7461 2.46% 300 3 633 SEQ ID NO: 7462 2.22% 270 4 1158 SEQ ID NO: 7463 2.22% 270 5 2565 SEQ ID NO: 7464 2.22% 270 6 2298 SEQ ID NO: 7465 1.77% 216 7 3159 SEQ ID NO: 7466 1.11% 135 8 640 SEQ ID NO: 7467 0.98% 120 9 2186 SEQ ID NO: 7468 0.74% 90 10 3869 SEQ ID NO: 7469 0.74% 90 11 2308 SEQ ID NO: 7470 0.66% 81 12 786 SEQ ID NO: 7471 0.55% 67.5 13 749 SEQ ID NO: 7472 0.49% 60 14 1080 SEQ ID NO: 7473 0.49% 60 15 2358 SEQ ID NO: 7474 0.49% 60 16 3955 SEQ ID NO: 7475 0.49% 60 17 714 SEQ ID NO: 7476 0.37% 45 18 1081 SEQ ID NO: 7477 0.37% 45 19 1170 SEQ ID NO: 7478 0.37% 45 20 1228 SEQ ID NO: 7479 0.37% 45 HLA A24-9 mers Максимально возможная оценка с использованием этой молекулы типа 1596.672 1 3797 SEQ ID NO: 7480 37.57% 600 2 4202 SEQ ID NO: 7481 37.57% 600 3 3189 SEQ ID NO: 7482 25.05% 400 4 1864 SEQ ID NO: 7483 23.14% 369.6 5 1066 SEQ ID NO: 7484 22.54% 360 6 2143 SEQ ID NO: 7485 22.54% 360 7 2693 SEQ ID NO: 7486 22.54% 360 8 1426 SEQ ID NO: 7487 18.78% 300 9 1238 SEQ ID NO: 7488 18.03% 288 10 3768 SEQ ID NO: 7489 18.03% 288 11 797 SEQ ID NO: 7490 15.03% 240 12 1882 SEQ ID NO: 7491 15.03% 240 13 1490 SEQ ID NO: 7492 13.77% 220 14 2237 SEQ ID NO: 7493 13.77% 220 15 95 SEQ ID NO: 7494 12.52% 200 16 1821 SEQ ID NO: 7495 12.52% 200 17 2289 SEQ ID NO: 7496 12.52% 200 18 3080 SEQ ID NO: 7497 12.52% 200 19 3660 SEQ ID NO: 7498 12.52% 200 20 4354 SEQ ID NO: 7499 12.52% 200 HLA A24-10 mers Максимально возможная оценка с использованием этой молекулы типа 1596.672 1 2143 SEQ ID NO: 7500 37.87% 604.8 2 1159 SEQ ID NO: 7501 26.30% 420 3 1650 SEQ ID NO: 7502 26.30% 420 4 1150 SEQ ID NO: 7503 18.78% 300 5 2763 SEQ ID NO: 7504 18.78% 300 6 3165 SEQ ID NO: 7505 18.78% 300 7 3201 SEQ ID NO: 7506 15.03% 240 8 3694 SEQ ID NO: 7507 15.03% 240 9 4204 SEQ ID NO: 7508 15.03% 240 10 1692 SEQ ID NO: 7509 13.77% 220 11 797 SEQ ID NO: 7510 12.52% 200 12 1610 SEQ ID NO: 7511 12.52% 200 13 1789 SEQ ID NO: 7512 12.52% 200 14 1881 SEQ ID NO: 7513 12.52% 200 15 3090 SEQ ID NO: 7514 12.52% 200 16 3763 SEQ ID NO: 7515 12.52% 200 17 2569 SEQ ID NO: 7516 11.27% 180 18 194 SEQ ID NO: 7517 9.39% 150 19 1771 SEQ ID NO: 7518 9.39% 150 20 2488 SEQ ID NO: 7519 9.39% 150 HLA A 0201-9 mers Максимально возможная оценка с использованием этой молекулы типа 3925227.1 1 2308 SEQ ID NO: 7520 0.20% 8144.13515256 2 3729 SEQ ID NO: 7521 0.10% 4047.23088 3 3574 SEQ ID NO: 7522 0.09% 3547.4996634 4 3615 SEQ ID NO: 7523 0.06% 2722.682592 5 3159 SEQ ID NO: 7524 0.05% 1999.734264 6 2339 SEQ ID NO: 7525 0.03% 1551.92907744 7 2201 SEQ ID NO: 7526 0.03% 1521.53694 8 3559 SEQ ID NO: 7527 0.02% 1174.38939504 9 3085 SEQ ID NO: 7528 0.02% 1146.296448 10 4070 SEQ ID NO: 7529 0.02% 970.4103696 11 3708 SEQ ID NO: 7530 0.02% 958.92888 12 3098 SEQ ID NO: 7531 0.02% 942.678 13 1362 SEQ ID NO: 7532 0.02% 900.6984 14 3563 SEQ ID NO: 7533 0.01% 735.86016 15 3774 SEQ ID NO: 7534 0.01% 687.655656 16 4242 SEQ ID NO: 7535 0.01% 685.78272 17 2340 SEQ ID NO: 7536 0.01% 668.37342936 18 650 SEQ ID NO: 7537 0.01% 640.1983392 19 3862 SEQ ID NO: 7538 0.01% 620.57772 20 2860 SEQ ID NO: 7539 0.01% 607.88448 HLA A 0201-10 mers Максимально возможная оценка с использованием этой молекулы типа 3925227.1 1 2307 SEQ ID NO: 7540 0.40% 15915.66281448 2 2201 SEQ ID NO: 7541 0.12% 4772.09313 3 3558 SEQ ID NO: 7542 0.05% 2295.04855632 4 1772 SEQ ID NO: 7543 0.04% 1759.6656 5 3087 SEQ ID NO: 7544 0.03% 1215.76896 6 2339 SEQ ID NO: 7545 0.02% 1116.29986272 7 2308 SEQ ID NO: 7546 0.02% 970.14776112 8 3061 SEQ ID NO: 7547 0.02% 836.2552104 9 2748 SEQ ID NO: 7548 0.01% 726.706344 10 3837 SEQ ID NO: 7549 0.01% 720.8292 11 59 SEQ ID NO: 7550 0.01% 650.3112 12 2877 SEQ ID NO: 7551 0.01% 620.22996 13 4114 SEQ ID NO: 7552 0.01% 559.8936 14 805 SEQ ID NO: 7553 0.01% 484.4565072 15 1655 SEQ ID NO: 7554 0.01% 437.48208 16 611 SEQ ID NO: 7555 0.00% 319.9392 17 1961 SEQ ID NO: 7556 0.00% 305.94186 18 1223 SEQ ID NO: 7557 0.00% 289.08792 19 852 SEQ ID NO: 7558 0.00% 285.67242 20 2139 SEQ ID NO: 7559 0.00% 284.845869 HLA A 1101-9 mers Максимально возможная оценка с использованием этой молекулы тип 36 1 4200 SEQ ID NO: 7560 50% 18 2 281 SEQ ID NO: 7561 25% 9 3 3236 SEQ ID NO: 7562 25% 9 4 509 SEQ ID NO: 7563 16.66% 6 5 848 SEQ ID NO: 7564 16.66% 6 6 2193 SEQ ID NO: 7565 16.66% 6 7 3542 SEQ ID NO: 7566 16.66% 6 8 541 SEQ ID NO: 7567 15% 5.4 9 1748 SEQ ID NO: 7568 12.5% 4.5 10 829 SEQ ID NO: 7569 11.11% 4 11 1149 SEQ ID NO: 7570 11.11% 4 12 2027 SEQ ID NO: 7571 11.11% 4 13 2576 SEQ ID NO: 7572 11.11% 4 14 873 SEQ ID NO: 7573 8.33% 3 15 2725 SEQ ID NO: 7574 8.33% 3 16 3541 SEQ ID NO: 7575 8.33% 3 17 1837 SEQ ID NO: 7576 7.5% 2.7 18 2475 SEQ ID NO: 7577 7.5% 2.7 19 2703 SEQ ID NO: 7578 7.5% 2.7 20 1823 SEQ ID NO: 7579 6.66% 2.4 HLA A 1101-10 mers Максимально возможная оценка с использованием этой молекулы тип 36 1 3541 SEQ ID NO: 7580 50% 18 2 281 SEQ ID NO: 7581 25% 9 3 1495 SEQ ID NO: 7582 25% 9 4 2303 SEQ ID NO: 7583 25% 9 5 2616 SEQ ID NO: 7584 25% 9 6 48 SEQ ID NO: 7585 16.66% 6 7 1394 SEQ ID NO: 7586 16.66% 6 8 1499 SEQ ID NO: 7587 16.66% 6 9 1862 SEQ ID NO: 7588 16.66% 6 10 1163 SEQ ID NO: 7589 11.11% 4 11 4006 SEQ ID NO: 7590 11.11% 4 12 4344 SEQ ID NO: 7591 11.11% 4 13 633 SEQ ID NO: 7592 10% 3.6 14 119 SEQ ID NO: 7593 8.33% 3 15 1190 SEQ ID NO: 7594 8.33% 3 16 1195 SEQ ID NO: 7595 8.33% 3 17 1725 SEQ ID NO: 7596 8.33% 3 18 2728 SEQ ID NO: 7597 8.33% 3 19 2895 SEQ ID NO: 7598 8.33% 3 20 3033 SEQ ID NO: 7599 8.33% 3 HLA B7-9 mers Максимально возможная оценка с использованием этой молекулы типа 5400 1 1335 SEQ ID NO: 7600 4.44% 240 2 2580 SEQ ID NO: 7601 4.44% 240 3 1703 SEQ ID NO: 7602 3.70% 200 4 113 SEQ ID NO: 7603 2.22% 120 5 168 SEQ ID NO: 7604 2.22% 120 6 2842 SEQ ID NO: 7605 2.22% 120 7 4027 SEQ ID NO: 7606 2.22% 120 8 3680 SEQ ID NO: 7607 1.66% 90 9 2085 SEQ ID NO: 7608 1.48% 80 10 2492 SEQ ID NO: 7609 1.48% 80 11 2660 SEQ ID NO: 7610 1.48% 80 12 2906 SEQ ID NO: 7611 1.48% 80 13 3346 SEQ ID NO: 7612 1.48% 80 14 4038 SEQ ID NO: 7613 1.48% 80 15 1163 SEQ ID NO: 7614 1.11% 60 16 1457 SEQ ID NO: 7615 1.11% 60 17 2351 SEQ ID NO: 7616 1.11% 60 18 2471 SEQ ID NO: 7617 1.11% 60

19 3499 SEQ ID NO: 7618 1.11% 60 20 3635 SEQ ID NO: 7619 1.11% 60 HLA B7-10 mers Максимально возможная оценка с использованием этой молекулы типа 5400 1 1703 SEQ ID NO: 7620 3.70% 200 2 17 SEQ ID NO: 7621 2.22% 120 3 3008 SEQ ID NO: 7622 2.22% 120 4 4106 SEQ ID NO: 7623 2.22% 120 5 3450 SEQ ID NO: 7624 1.66% 90 6 113 SEQ ID NO: 7625 1.48% 80 7 195 SEQ ID NO: 7626 1.48% 80 8 307 SEQ ID NO: 7627 1.48% 80 9 780 SEQ ID NO: 7628 1.48% 80 10 1000 SEQ ID NO: 7629 1.48% 80 11 1072 SEQ ID NO: 7630 1.48% 80 12 1404 SEQ ID NO: 7631 1.48% 80 13 1980 SEQ ID NO: 7632 1.48% 80 14 2262 SEQ ID NO: 7633 1.48% 80 15 2543 SEQ ID NO: 7634 1.48% 80 16 2906 SEQ ID NO: 7635 1.48% 80 17 3077 SEQ ID NO: 7636 1.48% 80 18 3175 SEQ ID NO: 7637 1.48% 80 19 4195 SEQ ID NO: 7638 1.48% 80 20 4251 SEQ ID NO: 7639 1.48% 80

[1674] ТАБЛИЦА-US-00078 Таблица 14 Эпитопы для SEQ ID нет: 6040 Начало % от макс. Ранг позиция последовательность оценка оценка HLA A1-9 mers Максимально возможная оценка с использованием этой молекулы типа 5625 1 20 SEQ ID NO: 7640 0.04% 2.25 2 91 SEQ ID NO: 7641 0.01% 1 3 125 SEQ ID NO: 7642 0.01% 0.75 4 56 SEQ ID NO: 7643 0.00% 0.5 5 145 SEQ ID NO: 7644 0.00% 0.5 HLA A1-10 mers Максимально возможная оценка с использованием этой молекулы типа 5625 1 20 SEQ ID NO: 7645 0.01% 0.9 2 56 SEQ ID NO: 7646 0.00% 0.5 3 71 SEQ ID NO: 7647 0.00% 0.5 4 144 SEQ ID NO: 7648 0.00% 0.5 HLA A3-9 mers Максимально возможная оценка с использованием этой молекулы типа 12150 1 115 SEQ ID NO: 7649 0.24% 30 2 87 SEQ ID NO: 7650 0.04% 6 3 80 SEQ ID NO: 7651 0.03% 4.05 4 125 SEQ ID NO: 7652 0.01% 1.8 5 39 SEQ ID NO: 7653 0.01% 1.5 6 56 SEQ ID NO: 7654 0.01% 1.5 7 135 SEQ ID NO: 7655 0.00% 1.2 8 91 SEQ ID NO: 7656 0.00% 1 9 119 SEQ ID NO: 7657 0.00% 1 10 141 SEQ ID NO: 7658 0.00% 0.9 11 150 SEQ ID NO: 7659 0.00% 0.6 12 137 SEQ ID NO: 7660 0.00% 0.54 HLA A3-10 mers Максимально возможная оценка с использованием этой молекулы типа 12150

1 36 SEQ ID NO: 7661 0.24% 30 2 144 SEQ ID NO: 7662 0.06% 8 3 101 SEQ ID NO: 7663 0.03% 4 4 99 SEQ ID NO: 7664 0.02% 3.6 5 80 SEQ ID NO: 7665 0.02% 2.7 6 125 SEQ ID NO: 7666 0.01% 1.6875 7 71 SEQ ID NO: 7667 0.01% 1.5 8 118 SEQ ID NO: 7668 0.01% 1.5 9 40 SEQ ID NO: 7669 0.01% 1.35 10 5 SEQ ID NO: 7670 0.00% 0.9 11 56 SEQ ID NO: 7671 0.00% 0.9 12 107 SEQ ID NO: 7672 0.00% 0.6 13 135 SEQ ID NO: 7673 0.00% 0.6 14 141 SEQ ID NO: 7674 0.00% 0.6 15 148 SEQ ID NO: 7675 0.00% 0.6 16 116 SEQ ID NO: 7676 0.00% 0.5 HLA A24-9 mers Максимально возможная оценка с использованием этой молекулы типа 1596.672 1 153 SEQ ID NO: 7677 1.05% 16.8 2 80 SEQ ID NO: 7678 0.75% 12 3 123 SEQ ID NO: 7679 0.50% 8 4 137 SEQ ID NO: 7680 0.50% 8 5 9 SEQ ID NO: 7681 0.45% 7.2 6 77 SEQ ID NO: 7682 0.45% 7.2 7 112 SEQ ID NO: 7683 0.45% 7.2 8 73 SEQ ID NO: 7684 0.41% 6.6 9 32 SEQ ID NO: 7685 0.37% 6 10 110 SEQ ID NO: 7686 0.37% 6 11 140 SEQ ID NO: 7687 0.37% 6 12 143 SEQ ID NO: 7688 0.37% 6 13 18 SEQ ID NO: 7689 0.30% 4.8 14 54 SEQ ID NO: 7690 0.30% 4.8 15 108 SEQ ID NO: 7691 0.30% 4.8 16 141 SEQ ID NO: 7692 0.30% 4.8 17 92 SEQ ID NO: 7693 0.27% 4.4 18 33 SEQ ID NO: 7694 0.25% 4 19 49 SEQ ID NO: 7695 0.25% 4 20 111 SEQ ID NO: 7696 0.25% 4 HLA A24-10 mers Максимально возможная оценка с использованием этой молекулы типа 1596.672 1 142 SEQ ID NO: 7697 12.52% 200 2 110 SEQ ID NO: 7698 0.75% 12 3 99 SEQ ID NO: 7699 0.50% 8 4 8 SEQ ID NO: 7700 0.45% 7.2 5 140 SEQ ID NO: 7701 0.45% 7.2 6 32 SEQ ID NO: 7702 0.37% 6 7 17 SEQ ID NO: 7703 0.30% 4.8 8 53 SEQ ID NO: 7704 0.30% 4.8 9 76 SEQ ID NO: 7705 0.30% 4.8 10 107 SEQ ID NO: 7706 0.30% 4.8 11 111 SEQ ID NO: 7707 0.30% 4.8 12 72 SEQ ID NO: 7708 0.27% 4.4 13 91 SEQ ID NO: 7709 0.27% 4.4 14 31 SEQ ID NO: 7710 0.25% 4 15 127 SEQ ID NO: 7711 0.25% 4 16 139 SEQ ID NO: 7712 0.25% 4 17 80 SEQ ID NO: 7713 0.22% 3.6 18 38 SEQ ID NO: 7714 0.18% 3 19 118 SEQ ID NO: 7715 0.18% 3 20 49 SEQ ID NO: 7716 0.12% 2 HLA A 0201-9 mers Максимально возможная оценка с использованием этой молекулы типа 3925227.1 1 80 SEQ ID NO: 7717 0.00% 171.96732 2 147 SEQ ID NO: 7718 0.00% 51.46848 3 143 SEQ ID NO: 7719 0.00% 11.6146182 4 56 SEQ ID NO: 7720 0.00% 11.304684 5 10 SEQ ID NO: 7721 0.00% 10.34586 6 6 SEQ ID NO: 7722 0.00% 6.56830734 7 26 SEQ ID NO: 7723 0.00% 6.07614 8 141 SEQ ID NO: 7724 0.00% 5.981472 9 148 SEQ ID NO: 7725 0.00% 5.194044 10 9 SEQ ID NO: 7726 0.00% 4.299183 11 137 SEQ ID NO: 7727 0.00% 4.299183 12 130 SEQ ID NO: 7728 0.00% 4.138344 13 84 SEQ ID NO: 7729 0.00% 3.42792 14 27 SEQ ID NO: 7730 0.00% 3.383484 15 2 SEQ ID NO: 7731 0.00% 3.381 16 62 SEQ ID NO: 7732 0.00% 3.251556 17 23 SEQ ID NO: 7733 0.00% 2.9542005 18 99 SEQ ID NO: 7734 0.00% 1.982232 19 33 SEQ ID NO: 7735 0.00% 1.86921 20 111 SEQ ID NO: 7736 0.00% 1.76402985 HLA A 0201-10 mers Максимально возможная оценка с использованием этой молекулы типа 3925227.1 1 5 SEQ ID NO: 7737 0.00% 159.9696 2 25 SEQ ID NO: 7738 0.00% 69.552 3 80 SEQ ID NO: 7739 0.00% 36.5148 4 107 SEQ ID NO: 7740 0.00% 21.3624 5 148 SEQ ID NO: 7741 0.00% 17.73576 6 61 SEQ ID NO: 7742 0.00% 13.9104 7 147 SEQ ID NO: 7743 0.00% 11.304684 8 53 SEQ ID NO: 7744 0.00% 8.230458 9 17 SEQ ID NO: 7745 0.00% 7.3086111 10 110 SEQ ID NO: 7746 0.00% 6.174104475 11 9 SEQ ID NO: 7747 0.00% 6.0858 12 99 SEQ ID NO: 7748 0.00% 5.6823984 13 2 SEQ ID NO: 7749 0.00% 3.188283 14 41 SEQ ID NO: 7750 0.00% 12.206413 15 135 SEQ ID NO: 7751 0.00% 12.076624 16 76 SEQ ID NO: 7752 0.00% 2.005692 17 23 SEQ ID NO: 7753 0.00% 1.798209 18 40 SEQ ID NO: 7754 0.00% 1.68996456 19 39 SEQ ID NO: 7755 0.00% 1.516482 20 118 SEQ ID NO: 7756 0.00% 1.2683304 HLA A 1101-9 mers Максимально возможная оценка с использованием этой молекулы тип 36 1 91 SEQ ID NO: 7757 2.77% 1 HLA A 1101-10 mers Максимально возможная оценка с использованием этой молекулы тип 36 1 101 SEQ ID NO: 7758 33.33% 12 2 71 SEQ ID NO: 7759 2.77% 1 3 90 SEQ ID NO: 7760 1.66% 0.6 HLA B7-9 mers Максимально возможная оценка с использованием этой молекулы типа 5400 1 49 SEQ ID NO: 7761 2.22% 120 2 9 SEQ ID NO: 7762 1.11% 60 3 73 SEQ ID NO: 7763 0.66% 36 4 33 SEQ ID NO: 7764 0.37% 20 5 137 SEQ ID NO: 7765 0.37% 20 6 141 SEQ ID NO: 7766 0.37% 20 7 77 SEQ ID NO: 7767 0.22% 12 8 112 SEQ ID NO: 7768 0.22% 12 9 143 SEQ ID NO: 7769 0.22% 12 10 81 SEQ ID NO: 7770 0.14% 8 11 13 SEQ ID NO: 7771 0.09% 5 12 69 SEQ ID NO: 7772 0.09% 5 13 18 SEQ ID NO: 7773 0.07% 4 14 32 SEQ ID NO: 7774 0.07% 4 15 54 SEQ ID NO: 7775 0.07% 4 16 80 SEQ ID NO: 7776 0.07% 4 17 92 SEQ ID NO: 7777 0.07% 4 18 108 SEQ ID NO: 7778 0.07% 4 19 111 SEQ ID NO: 7779 0.07% 4 20 123 SEQ ID NO: 7780 0.07% 4 HLA B7-10 mers Максимально возможная оценка с использованием этой молекулы типа 5400 1 99 SEQ ID NO: 7781 0.74% 40 2 17 SEQ ID NO: 7782 0.37% 20 3 8 SEQ ID NO: 7783 0.22% 12 4 72 SEQ ID NO: 7784 0.22% 12 5 91 SEQ ID NO: 7785 0.22% 12 6 127 SEQ ID NO: 7786 0.11% 6 7 31 SEQ ID NO: 7787 0.07% 4 8 32 SEQ ID NO: 7788 0.07% 4 9 53 SEQ ID NO: 7789 0.07% 4 10 76 SEQ ID NO: 7790 0.07% 4 11 107 SEQ ID NO: 7791 0.07% 4 12 110 SEQ ID NO: 7792 0.07% 4 13 111 SEQ ID NO: 7793 0.07% 4 14 140 SEQ ID NO: 7794 0.07% 4 15 9 SEQ ID NO: 7795 0.05% 3 16 19 SEQ ID NO: 7796 0.05% 3 17 33 SEQ ID NO: 7797 0.03% 2 18 93 SEQ ID NO: 7798 0.03% 2 19 102 SEQ ID NO: 7799 0.03% 2 20 129 SEQ ID NO: 7800 0.02% 1.5

[1675] ТАБЛИЦА-США-00079 Таблица 15 Эпитопы для SEQ ID нет: 6041 % от Начни с Макса. Ранг позиция последовательность оценка оценка HLA B7-10 mers Максимально возможный балл при использовании 5625 этот тип молекулы 1 1818 SEQ ID NO: 7801 1.6% 90 2 373 SEQ ID NO: 7802 1.33% 75 3 681 SEQ ID NO: 7803 1.33% 75 4 74 SEQ ID NO: 7804 0.88% 50 5 786 SEQ ID NO: 7805 0.88% 50 6 1495 SEQ ID NO: 7806 0.88% 50 7 88 SEQ ID NO: 7807 0.8% 45 8 357 SEQ ID NO: 7808 0.8% 45 9 1271 SEQ ID NO: 7809 0.8% 45 10 1799 SEQ ID NO: 7810 0.8% 45 11 1393 SEQ ID NO: 7811 0.48% 27 12 386 SEQ ID NO: 7812 0.44% 25 13 2304 SEQ ID NO: 7813 0.44% 25 14 198 SEQ ID NO: 7814 0.4% 22.5 15 840 SEQ ID NO: 7815 0.4% 22.5 16 2359 SEQ ID NO: 7816 0.4% 22.5 17 1194 SEQ ID NO: 7817 0.32% 18 18 1546 SEQ ID NO: 7818 0.32% 18 19 2200 SEQ ID NO: 7819 0.22% 12.5 20 996 SEQ ID NO: 7820 0.2% 11.25 HLA A1-9 mers Максимально возможный балл при использовании 5625 этот тип молекулы 1 995 SEQ ID NO: 7821 10% 562.5 2 1303 SEQ ID NO: 7822 2.22% 125 3 1582 SEQ ID NO: 7823 2% 112.5 4 1456 SEQ ID NO: 7824 1.6% 90 5 772 SEQ ID NO: 7825 1.11% 62.5 6 181 SEQ ID NO: 7826 0.88% 50 7 632 SEQ ID NO: 7827 0.88% 50 8 2281 SEQ ID NO: 7828 0.88% 50 9 1586 SEQ ID NO: 7829 0.8% 45 10 2109 SEQ ID NO: 7830 0.8% 45 11 745 SEQ ID NO: 7831 0.55% 31.25 12 1916 SEQ ID NO: 7832 0.53% 30 13 966 SEQ ID NO: 7833 0.44% 25 14 1387 SEQ ID NO: 7834 0.44% 25 15 2263 SEQ ID NO: 7835 0.44% 25 16 2457 SEQ ID NO: 7836 0.26% 15 17 1057 SEQ ID NO: 7837 0.22% 12.5 18 2562 SEQ ID NO: 7838 0.22% 12.5 19 74 SEQ ID NO: 7839 0.17% 10 20 298 SEQ ID NO: 7840 0.17% 10 HLA A1-10 mers Максимально возможный балл при использовании 12150 этот тип молекулы 1 536 SEQ ID NO: 7841 3.33% 405 2 986 SEQ ID NO: 7842 2.46% 300 3 805 SEQ ID NO: 7843 1.64% 200 4 2345 SEQ ID NO: 7844 1.48% 180 5 2481 SEQ ID NO: 7845 0.55% 67.5 6 204 SEQ ID NO: 7846 0.49% 60 7 895 SEQ ID NO: 7847 0.44% 54 8 1512 SEQ ID NO: 7848 0.44% 54 9 2491 SEQ ID NO: 7849 0.37% 45 10 436 SEQ ID NO: 7850 0.32% 40 11 917 SEQ ID NO: 7851 0.32% 40 12 1176 SEQ ID NO: 7852 0.32% 40 13 1517 SEQ ID NO: 7853 0.29% 36 14 466 SEQ ID NO: 7854 0.24% 30 15 1784 SEQ ID NO: 7855 0.24% 30 16 2039 SEQ ID NO: 7856 0.24% 30 17 2124 SEQ ID NO: 7857 0.24% 30 18 1049 SEQ ID NO: 7858 0.22% 27 19 2200 SEQ ID NO: 7859 0.22% 27 20 2598 SEQ ID NO: 7860 0.22% 27 HLA A3-9 mers Максимально возможный балл при использовании 12150 этот тип молекулы 1 392 SEQ ID NO: 7861 2.46% 300 2 2230 SEQ ID NO: 7862 1.48% 180 3 590 SEQ ID NO: 7863 1.11% 135 4 697 SEQ ID NO: 7864 1.11% 135 5 919 SEQ ID NO: 7865 0.74% 90 6 1354 SEQ ID NO: 7866 0.74% 90 7 1430 SEQ ID NO: 7867 0.74% 90 8 2534 SEQ ID NO: 7868 0.74% 90 9 202 SEQ ID NO: 7869 0.49% 60 10 488 SEQ ID NO: 7870 0.49% 60 11 922 SEQ ID NO: 7871 0.49% 60 12 1735 SEQ ID NO: 7872 0.49% 60 13 2281 SEQ ID NO: 7873 0.49% 60 14 1894 SEQ ID NO: 7874 0.44% 54 15 2552 SEQ ID NO: 7875 0.44% 54 16 555 SEQ ID NO: 7876 0.37% 45 17 1134 SEQ ID NO: 7877 0.37% 45 18 1149 SEQ ID NO: 7878 0.29% 36 19 283 SEQ ID NO: 7879 0.24% 30 20 917 SEQ ID NO: 7880 0.24% 30 HLA A3-10 mers Максимально возможная оценка с использованием 1596.672 этот тип молекулы 1 2375 SEQ ID NO: 7881 36.07% 576 2 1751 SEQ ID NO: 7882 28.93% 462 3 195 SEQ ID NO: 7883 25.05% 400 4 2306 SEQ ID NO: 7884 21.04% 336 5 806 SEQ ID NO: 7885 20.66% 330 6 1252 SEQ ID NO: 7886 18.78% 300 7 160 SEQ ID NO: 7887 15.03% 240 8 517 SEQ ID NO: 7888 15.03% 240 9 375 SEQ ID NO: 7889 12.52% 200 10 1275 SEQ ID NO: 7890 12.52% 200 11 2175 SEQ ID NO: 7891 12.52% 200 12 2207 SEQ ID NO: 7892 12.52% 200 13 2343 SEQ ID NO: 7893 12.52% 200 14 443 SEQ ID NO: 7894 11.27% 180 15 668 SEQ ID NO: 7895 7.51% 120 16 1825 SEQ ID NO: 7896 6.88% 110 17 1690 SEQ ID NO: 7897 4.69% 75 18 159 SEQ ID NO: 7898 3.75% 60 19 2550 SEQ ID NO: 7899 3.75% 60 20 1949 SEQ ID NO: 7900 3.38% 54 HLA A24-9 mers Максимально возможная оценка с использованием 1596.672 этот тип молекулы 1 641 SEQ ID NO: 7901 45.09% 720 2 809 SEQ ID NO: 7902 24.80% 396 3 1209 SEQ ID NO: 7903 22.54% 360 4 216 SEQ ID NO: 7904 18.03% 288 5 159 SEQ ID NO: 7905 15.03% 240 6 528 SEQ ID NO: 7906 15.03% 240 7 799 SEQ ID NO: 7907 15.03% 240 8 1436 SEQ ID NO: 7908 15.03% 240 9 2219 SEQ ID NO: 7909 15.03% 240 10 1065 SEQ ID NO: 7910 13.77% 220 11 1953 SEQ ID NO: 7911 13.15% 210 12 1966 SEQ ID NO: 7912 12.52% 200 13 2600 SEQ ID NO: 7913 12.52% 200 14 71 SEQ ID NO: 7914 9.39% 150 15 380 SEQ ID NO: 7915 9.39% 150 16 1989 SEQ ID NO: 7916 9.39% 150 17 342 SEQ ID NO: 7917 8.76% 140 18 1071 SEQ ID NO: 7918 8.76% 140 19 2570 SEQ ID NO: 7919 6.88% 110 20 2550 SEQ ID NO: 7920 6.26% 100 HLA A24-10 mers Максимально возможная оценка с использованием 3925227.1 этот тип молекулы 1 1632 SEQ ID NO: 7921 0.09% 3607.31448 2 1640 SEQ ID NO: 7922 0.04% 1748.2560912 3 1776 SEQ ID NO: 7923 0.03% 1492.58592 4 2512 SEQ ID NO: 7924 0.03% 1434.16845 5 1073 SEQ ID NO: 7925 0.03% 1338.876 6 230 SEQ ID NO: 7926 0.01% 685.78272 7 1001 SEQ ID NO: 7927 0.01% 559.8936 8 716 SEQ ID NO: 7928 0.01% 558.27486 9 2280 SEQ ID NO: 7929 0.01% 511.19781048 10 590 SEQ ID NO: 7930 0.01% 469.6692 11 664 SEQ ID NO: 7931 0.01% 442.076389524 12 1094 SEQ ID NO: 7932 0.00% 382.536 13 1735 SEQ ID NO: 7933 0.00% 382.536 14 1625 SEQ ID NO: 7934 0.00% 342.4606344 15 1974 SEQ ID NO: 7935 0.00% 336.885048 16 2382 SEQ ID NO: 7936 0.00% 319.9392 17 2417 SEQ ID NO: 7937 0.00% 319.9392 18 744 SEQ ID NO: 7938 0.00% 256.416670125 19 108 SEQ ID NO: 7939 0.00% 232.52724 20 390 SEQ ID NO: 7940 0.00% 228.0411084 HLA A 0201-9 mers Максимально возможная оценка с использованием 3925227.1 этот тип молекулы 1 2511 SEQ ID NO: 7941 0.38% 15126.90795 2 1608 SEQ ID NO: 7942 0.05% 2049.4656 3 2572 SEQ ID NO: 7943 0.04% 1879.5921264 4 255 SEQ ID NO: 7944 0.03% 1566.6522795 5 895 SEQ ID NO: 7945 0.03% 1338.876 6 1171 SEQ ID NO: 7946 0.02% 1107.960876 7 1691 SEQ ID NO: 7947 0.01% 782.95521024 8 20 SEQ ID NO: 7948 0.01% 549.9372312 9 1632 SEQ ID NO: 7949 0.01% 479.041993296 10 2280 SEQ ID NO: 7950 0.01% 472.418344576987 11 1963 SEQ ID NO: 7951 0.00% 358.73928 12 1955 SEQ ID NO: 7952 0.00% 331.093464 13 741 SEQ ID NO: 7953 0.00% 318.652488 14 523 SEQ ID NO: 7954 0.00% 278.7876 15 1073 SEQ ID NO: 7955 0.00% 266.6988828 16 2489 SEQ ID NO: 7956 0.00% 243.432 17 777 SEQ ID NO: 7957 0.00% 218.5730664 18 1737 SEQ ID NO: 7958 0.00% 218.0785572 19 589 SEQ ID NO: 7959 0.00% 210.538251 20 229 SEQ ID NO: 7960 0.00% 205.230564 HLA A 0201-10 mers Максимально возможный балл при использовании 36 этот тип молекулы 1 2337 SEQ ID NO: 7961 33.33% 12 2 2156 SEQ ID NO: 7962 25% 9 3 492 SEQ ID NO: 7963 20% 7.2 4 18 SEQ ID NO: 7964 16.66% 6 5 332 SEQ ID NO: 7965 16.66% 6 6 415 SEQ ID NO: 7966 16.66% 6 7 2479 SEQ ID NO: 7967 16.66% 6 8 1495 SEQ ID NO: 7968 11.11% 4 9 2035 SEQ ID NO: 7969 11.11% 4 10 1349

SEQ ID NO: 7970 10% 3.6 11 1194 SEQ ID NO: 7971 8.33% 3 12 1648 SEQ ID NO: 7972 8.33% 3 13 96 SEQ ID NO: 7973 6.66% 2.4 14 764 SEQ ID NO: 7974 6.66% 2.4 15 986 SEQ ID NO: 7975 6.66% 2.4 16 2345 SEQ ID NO: 7976 6.66% 2.4 17 698 SEQ ID NO: 7977 5.55% 2 18 1355 SEQ ID NO: 7978 5.55% 2 19 1987 SEQ ID NO: 7979 5.55% 2 20 2085 SEQ ID NO: 7980 5.55% 2 HLA A 1101-9 mers Максимально возможный балл при использовании 36 этот тип молекулы 1 2083 SEQ ID NO: 7981 33.33% 12 2 2123 SEQ ID NO: 7982 25% 9 3 2147 SEQ ID NO: 7983 16.66% 6 4 331 SEQ ID NO: 7984 12.5% 4.5 5 1035 SEQ ID NO: 7985 11.11% 4 6 1064 SEQ ID NO: 7986 11.11% 4 7 2154 SEQ ID NO: 7987 11.11% 4 8 1048 SEQ ID NO: 7988 7.5% 2.7 9 202 SEQ ID NO: 7989 6.66% 2.4 10 721 SEQ ID NO: 7990 6.66% 2.4 11 2109 SEQ ID NO: 7991 6.66% 2.4 12 2230 SEQ ID NO: 7992 6.66% 2.4 13 1306 SEQ ID NO: 7993 5.55% 2 14 1622 SEQ ID NO: 7994 5.55% 2 15 1772 SEQ ID NO: 7995 5.55% 2 16 1796 SEQ ID NO: 7996 5.55% 2 17 186 SEQ ID NO: 7997 5% 1.8 18 414 SEQ ID NO: 7998 5% 1.8 19 697 SEQ ID NO: 7999 5% 1.8 20 1175 SEQ ID NO: 8000 5% 1.8 HLA A 1101-10 mers Максимально возможный балл при использовании 5400 этот тип молекулы 1 1447 SEQ ID NO: 8001 14.81% 800 2 642 SEQ ID NO: 8002 3.70% 200 3 34 SEQ ID NO: 8003 2.22% 120 4 186 SEQ ID NO: 8004 1.48% 80 5 244 SEQ ID NO: 8005 1.48% 80 6 459 SEQ ID NO: 8006 1.48% 80 7 1475 SEQ ID NO: 8007 1.48% 80 8 1867 SEQ ID NO: 8008 1.48% 80 9 2032 SEQ ID NO: 8009 1.48% 80

10 2047 SEQ ID NO: 8010 1.48% 80 11 2335 SEQ ID NO: 8011 1.48% 80 12 622 SEQ ID NO: 8012 1.11% 60 13 1375 SEQ ID NO: 8013 1.11% 60 14 1617 SEQ ID NO: 8014 0.92% 50 15 1023 SEQ ID NO: 8015 0.83% 45 16 286 SEQ ID NO: 8016 0.74% 40 17 490 SEQ ID NO: 8017 0.74% 40 18 810 SEQ ID NO: 8018 0.74% 40 19 1420 SEQ ID NO: 8019 0.74% 40 20 1854 SEQ ID NO: 8020 0.74% 40 HLA B7-9 mers Максимально возможный балл при использовании 5400 этот тип молекулы 1 1617 SEQ ID NO: 8021 3.70% 200 2 752 SEQ ID NO: 8022 2.22% 120 3 1552 SEQ ID NO: 8023 2.22% 120 4 154 SEQ ID NO: 8024 1.48% 80 5 165 SEQ ID NO: 8025 1.48% 80 6 383 SEQ ID NO: 8026 1.48% 80 7 1501 SEQ ID NO: 8027 1.48% 80 8 2093 SEQ ID NO: 8028 1.48% 80 9 2564 SEQ ID NO: 8029 1.48% 80 10 622 SEQ ID NO: 8030 1.11% 60 11 1086 SEQ ID NO: 8031 1.11% 60 12 1262 SEQ ID NO: 8032 1.11% 60 13 1556 SEQ ID NO: 8033 1.11% 60 14 845 SEQ ID NO: 8034 1% 54 15 286 SEQ ID NO: 8035 0.74% 40 16 490 SEQ ID NO: 8036 0.74% 40 17 552 SEQ ID NO: 8037 0.74% 40 18 1858 SEQ ID NO: 8038 0.74% 40 19 2107 SEQ ID NO: 8039 0.74% 40 20 2582 SEQ ID NO: 8040 0.74% 40

[1676] ТАБЛИЦА-США-00080 Таблица 16 Эпитопы для SEQ ID нет: 6042 Начало % от макс. Ранг позиция последовательность оценка оценка HLA A1-9 mers Максимально возможная оценка с использованием этой молекулы типа 5625 1 846 SEQ ID NO: 8041 2.22% 125 2 798 SEQ ID NO: 8042 1.6% 90 3 787 SEQ ID NO: 8043 0.88% 50 4 1178 SEQ ID NO: 8044 0.88% 50 5 637 SEQ ID NO: 8045 0.8% 45 6 557 SEQ ID NO: 8046 0.44% 25 7 1020 SEQ ID NO: 8047 0.44% 25 8 282 SEQ ID NO: 8048 0.32% 18 9 1241 SEQ ID NO: 8049 0.24% 13.5 10 466 SEQ ID NO: 8050 0.22% 12.5 11 727 SEQ ID NO: 8051 0.2% 11.25 12 706 SEQ ID NO: 8052 0.17% 10 13 324 SEQ ID NO: 8053 0.16% 9 14 752 SEQ ID NO: 8054 0.16% 9 15 54 SEQ ID NO: 8055 0.13% 7.5 16 554 SEQ ID NO: 8056 0.13% 7.5 17 590 SEQ ID NO: 8057 0.12% 6.75 18 569 SEQ ID NO: 8058 0.08% 5 19 613 SEQ ID NO: 8059 0.08% 5 20 90 SEQ ID NO: 8060 0.08% 4.5 HLA A1-10 mers Максимально возможная оценка с использованием этой молекулы типа 5625 1 1241 SEQ ID NO: 8061 4.8% 270 2 967 SEQ ID NO: 8062 0.8% 45 3 1010 SEQ ID NO: 8063 0.48% 27 4 426 SEQ ID NO: 8064 0.44% 25 5 809 SEQ ID NO: 8065 0.44% 25 6 1178 SEQ ID NO: 8066 0.44% 25 7 787 SEQ ID NO: 8067 0.22% 12.5 8 958 SEQ ID NO: 8068 0.22% 12.5 9 727 SEQ ID NO: 8069 0.2% 11.25 10 610 SEQ ID NO: 8070 0.17% 10 11 12 SEQ ID NO: 8071 0.13% 7.5 12 1181 SEQ ID NO: 8072 0.12% 6.75 13 373 SEQ ID NO: 8073 0.11% 6.25 14 602 SEQ ID NO: 8074 0.11% 6.25 15 20 SEQ ID NO: 8075 0.04% 2.5 16 32 SEQ ID NO: 8076 0.04% 2.5 17 53 SEQ ID NO: 8077 0.04% 2.5 18 400 SEQ ID NO: 8078 0.04% 2.5 19 557 SEQ ID NO: 8079 0.04% 2.5 20 667 SEQ ID NO: 8080 0.04% 2.5 HLA A3-9 mers Максимально возможная оценка с использованием этой молекулы типа 12150 1 768 SEQ ID NO: 8081 0.82% 100 2 808 SEQ ID NO: 8082 0.49% 60 3 85 SEQ ID NO: 8083 0.24% 30 4 663 SEQ ID NO: 8084 0.24% 30 5 1245 SEQ ID NO: 8085 0.14% 18 6 288 SEQ ID NO: 8086 0.09% 12 7 50 SEQ ID NO: 8087 0.08% 10 8 320 SEQ ID NO: 8088 0.07% 9 9 402 SEQ ID NO: 8089 0.07% 9 10 798 SEQ ID NO: 8090 0.07% 9 11 902 SEQ ID NO: 8091 0.06% 8.1 12 364 SEQ ID NO: 8092 0.05% 6.75 13 297 SEQ ID NO: 8093 0.04% 6 14 992 SEQ ID NO: 8094 0.04% 6 15 38 SEQ ID NO: 8095 0.03% 4.5 16 249 SEQ ID NO: 8096 0.03% 4.5 17 706 SEQ ID NO: 8097 0.03% 4.05 18 1204 SEQ ID NO: 8098 0.03% 4.05 19 1178 SEQ ID NO: 8099 0.03% 4 20 343 SEQ ID NO: 8100 0.02% 3.6 HLA A3-10 mers Максимально возможная оценка с использованием этой молекулы типа 12150 1 255 SEQ ID NO: 8101 1.48% 180 2 180 SEQ ID NO: 8102 0.55% 67.5 3 768 SEQ ID NO: 8103 0.49% 60 4 1177 SEQ ID NO: 8104 0.49% 60 5 380 SEQ ID NO: 8105 0.24% 30 6 100 SEQ ID NO: 8106 0.18% 22.5 7 786 SEQ ID NO: 8107 0.16% 20 8 1217 SEQ ID NO: 8108 0.16% 20 9 207 SEQ ID NO: 8109 0.14% 18 10 1183 SEQ ID NO: 8110 0.14% 18 11 38 SEQ ID NO: 8111 0.09% 12 12 52 SEQ ID NO: 8112 0.09% 12 13 8 SEQ ID NO: 8113 0.06% 8 14 679 SEQ ID NO: 8114 0.06% 8 15 73 SEQ ID NO: 8115 0.05% 6.75 16 1204 SEQ ID NO: 8116 0.05% 6.075 17 50 SEQ ID NO: 8117 0.04% 6 18 774 SEQ ID NO: 8118 0.04% 6 19 845 SEQ ID NO: 8119 0.04% 6 20 214 SEQ ID NO: 8120 0.04% 5.4 HLA A24-9 mers Максимально возможная оценка с использованием этой молекулы типа 1596.672 1 1118 SEQ ID NO: 8121 19.84% 316.8 2 51 SEQ ID NO: 8122 18.78% 300 3 161 SEQ ID NO: 8123 18.78% 300 4 434 SEQ ID NO: 8124 18.78% 300 5 365 SEQ ID NO: 8125 13.77% 220 6 736 SEQ ID NO: 8126 12.52% 200 7 620 SEQ ID NO: 8127 7.51% 120 8 1068 SEQ ID NO: 8128 7.51% 120 9 817 SEQ ID NO: 8129 3.75% 60 10 336 SEQ ID NO: 8130 3.44% 55 11 687 SEQ ID NO: 8131 3.13% 50 12 254 SEQ ID NO: 8132 2.34% 37.5 13 627 SEQ ID NO: 8133 1.87% 30 14 950 SEQ ID NO: 8134 1.75% 28 15 28 SEQ ID NO: 8135 1.56% 25 16 408 SEQ ID NO: 8136 1.56% 25 17 159 SEQ ID NO: 8137 1.31% 21 18 1166 SEQ ID NO: 8138 1.26% 20.16 19 45 SEQ ID NO: 8139 1.25% 20 20 185 SEQ ID NO: 8140 1.25% 20 HLA A24-10 mers Максимально возможная оценка с использованием этой молекулы типа 1596.672 1 438 SEQ ID NO: 8141 27.55% 440 2 489 SEQ ID NO: 8142 22.54% 360 3 254 SEQ ID NO: 8143 18.78% 300 4 354 SEQ ID NO: 8144 11.27% 180 5 406 SEQ ID NO: 8145 11.27% 180 6 1047 SEQ ID NO: 8146 11.27% 180 7 473 SEQ ID NO: 8147 7.51% 120 8 350 SEQ ID NO: 8148 6.26% 100 9 769 SEQ ID NO: 8149 6.26% 100 10 193 SEQ ID NO: 8150 5.63% 90 11 479 SEQ ID NO: 8151 3.13% 50 12 0 SEQ ID NO: 8152 2.70% 43.2 13 813 SEQ ID NO: 8153 1.87% 30 14 739 SEQ ID NO: 8154 1.50% 24 15 782 SEQ ID NO: 8155 1.50% 24 16 1186 SEQ ID NO: 8156 1.31% 21 17 910 SEQ ID NO: 8157 1.05% 16.8 18 128 SEQ ID NO: 8158 0.93% 15 19 183 SEQ ID NO: 8159 0.93% 15 20 1069 SEQ ID NO: 8160 0.93% 15 HLA A 0201-9 mers Максимально возможная оценка с использованием этой молекулы типа 3925227.1 1 1041 SEQ ID NO: 8161 0.01% 484.2379773 2 981 SEQ ID NO: 8162 0.00% 382.536 3 957 SEQ ID NO: 8163 0.00% 342.4606344 4 896 SEQ ID NO: 8164 0.00% 232.6931712 5 1173 SEQ ID NO: 8165 0.00% 201.447432 6 733 SEQ ID NO: 8166 0.00% 171.86796 7 410 SEQ ID NO: 8167 0.00% 135.45252 8 786 SEQ ID NO: 8168 0.00% 119.463012 9 150 SEQ ID NO: 8169 0.00% 102.17550222 10 1 SEQ ID NO: 8170 0.00% 94.98737754 11 595 SEQ ID NO: 8171 0.00% 93.239424 12 1095 SEQ ID NO: 8172 0.00% 89.41779 13 1166 SEQ ID NO: 8173 0.00% 87.58584 14 845 SEQ ID NO: 8174 0.00% 79.642008 15 734 SEQ ID NO: 8175 0.00% 73.47672 16 802 SEQ ID NO: 8176 0.00% 71.872056 17 1213 SEQ ID NO: 8177 0.00% 71.872056 18 105 SEQ ID NO: 8178 0.00% 50.232 19 939 SEQ ID NO: 8179 0.00% 49.13352 20 130 SEQ ID NO: 8180 0.00% 48.732354 HLA A 0201-10 mers Максимально возможная оценка с использованием этой молекулы типа 3925227.1 1 372 SEQ ID NO: 8181 0.04% 1896.33528 2 410 SEQ ID NO: 8182 0.02% 1134.00849744 3 162 SEQ ID NO: 8183 0.01% 685.3897512 4 1076 SEQ ID NO: 8184 0.01% 640.90320525 5 1196 SEQ ID NO: 8185 0.01% 623.742666372 6 353 SEQ ID NO: 8186 0.01% 446.7384576 7 50 SEQ ID NO: 8187 0.00% 375.97824 8 733 SEQ ID NO: 8188 0.00% 271.863864 9 130 SEQ ID NO: 8189 0.00% 235.6873848 10 415 SEQ ID NO: 8190 0.00% 185.679 11 297 SEQ ID NO: 8191 0.00% 177.496704 12 1 SEQ ID NO: 8192 0.00% 152.42160582 13 56 SEQ ID NO: 8193 0.00% 110.013876 14 732 SEQ ID NO: 8194 0.00% 101.0988 15 6 SEQ ID NO: 8195 0.00% 98.26704 16 261 SEQ ID NO: 8196 0.00% 91.60164 17 1040 SEQ ID NO: 8197 0.00% 76.98537 18 928 SEQ ID NO: 8198 0.00% 71.2908 19 1188 SEQ ID NO: 8199 0.00% 69.81282 20 1094 SEQ ID NO: 8200 0.00% 52.5987 HLA A 1101-9 mers Максимально возможная оценка с использованием этой молекулы тип 36 1 402 SEQ ID NO: 8201 25% 9 2 902 SEQ ID NO: 8202 22.5% 8.1 3 288 SEQ ID NO: 8203 11.11% 4 4 85 SEQ ID NO: 8204 6.66% 2.4 5 706 SEQ ID NO: 8205 6.66% 2.4 6 456 SEQ ID NO: 8206 5.55% 2 7 920 SEQ ID NO: 8207 5.55% 2 8 535 SEQ ID NO: 8208 5% 1.8 9 364 SEQ ID NO: 8209 3.33% 1.2 10 438 SEQ ID NO: 8210 3.33% 1.2 11 798 SEQ ID NO: 8211 3.33% 1.2 12 808 SEQ ID NO: 8212 3.33% 1.2 13 937 SEQ ID NO: 8213 3.33% 1.2 14 956 SEQ ID NO: 8214 3.33% 1.2 15 557 SEQ ID NO: 8215 2.77% 1 16 1218 SEQ ID NO: 8216 2.77% 1 17 784 SEQ ID NO: 8217 2.5% 0.9 18 249 SEQ ID NO: 8218 2.22% 0.8 19 768 SEQ ID NO: 8219 2.22% 0.8 20 1178 SEQ ID NO: 8220 2.22% 0.8 HLA A 1101-10 mers Максимально возможная оценка с использованием этой молекулы тип 36 1 38 SEQ ID NO: 8221 13.33% 4.8 2 807 SEQ ID NO: 8222 12.5% 4.5 3 100 SEQ ID NO: 8223 11.11% 4 4 380 SEQ ID NO: 8224 11.11% 4 5 767 SEQ ID NO: 8225 10% 3.6 6 533 SEQ ID NO: 8226 8.33% 3 7 967 SEQ ID NO: 8227 6.66% 2.4 8 919 SEQ ID NO: 8228 5.55% 2 9 305 SEQ ID NO: 8229 5% 1.8 10 211 SEQ ID NO: 8230 3.33% 1.2 11 511 SEQ ID NO: 8231 3.33% 1.2 12 1177 SEQ ID NO: 8232 3.33% 1.2 13 429 SEQ ID NO: 8233 2.77% 1 14 758 SEQ ID NO: 8234 2.77% 1 15 797 SEQ ID NO: 8235 2.5% 0.9 16 255 SEQ ID NO: 8236 2.22% 0.8 17 986 SEQ ID NO: 8237 2.22% 0.8 18 1157 SEQ ID NO: 8238 2.22% 0.8 19 170 SEQ ID NO: 8239 1.66% 0.6 20 893 SEQ ID NO: 8240 1.66% 0.6 HLA B7-9 mers Максимально возможная оценка с использованием этой молекулы типа 5400 1 200 SEQ ID NO: 8241 1.48% 80 2 1243 SEQ ID NO: 8242 1.48% 80 3 123 SEQ ID NO: 8243 0.74% 40 4 248 SEQ ID NO: 8244 0.66% 36 5 1036 SEQ ID NO: 8245 0.66% 36 6 494 SEQ ID NO: 8246 0.37% 20 7 495 SEQ ID NO: 8247 0.37% 20 8 523 SEQ ID NO: 8248 0.37% 20 9 842 SEQ ID NO: 8249 0.37% 20 10 932 SEQ ID NO: 8250 0.37% 20 11 274 SEQ ID NO: 8251 0.33% 18 12 588 SEQ ID NO: 8252 0.22% 12 13 656 SEQ ID NO: 8253 0.22% 12 14 657 SEQ ID NO: 8254 0.22% 12 15 767 SEQ ID NO: 8255 0.22% 12 16 911 SEQ ID NO: 8256 0.22% 12 17 939 SEQ ID NO: 8257 0.22% 12 18 1007 SEQ ID NO: 8258 0.22% 12 19 1170 SEQ ID NO: 8259 0.22% 12 20 1206 SEQ ID NO: 8260 0.22% 12 HLA B7-10 mers

Максимально возможная оценка с использованием этой молекулы типа 5400 1 505 SEQ ID NO: 8261 4.44% 240 2 312 SEQ ID NO: 8262 3.70% 200 3 141 SEQ ID NO: 8263 1.11% 60 4 1006 SEQ ID NO: 8264 0.66% 36 5 411 SEQ ID NO: 8265 0.44% 24 6 122 SEQ ID NO: 8266 0.37% 20 7 134 SEQ ID NO: 8267 0.37% 20 8 184 SEQ ID NO: 8268 0.37% 20 9 367 SEQ ID NO: 8269 0.37% 20 10 402 SEQ ID NO: 8270 0.37% 20 11 494 SEQ ID NO: 8271 0.37% 20 12 560 SEQ ID NO: 8272 0.37% 20 13 626 SEQ ID NO: 8273 0.37% 20 14 931 SEQ ID NO: 8274 0.37% 20 15 956 SEQ ID NO: 8275 0.37% 20 16 1117 SEQ ID NO: 8276 0.37% 20 17 1169 SEQ ID NO: 8277 0.37% 20 18 1196 SEQ ID NO: 8278 0.37% 20 19 247 SEQ ID NO: 8279 0.22% 12 20 273 SEQ ID NO: 8280 0.22% 12

[1677] ТАБЛИЦА-США-00081 Таблица 17 Эпитопы для SEQ ID нет: 6043 Начало % от макс. Ранг позиция последовательность оценка оценка HLA A1-9 mers Максимально возможная оценка с использованием этой молекулы типа 5625 1 168 SEQ ID NO: 8281 0.2% 11.25 2 212 SEQ ID NO: 8282 0.08% 4.5 3 223 SEQ ID NO: 8283 0.08% 4.5 4 104 SEQ ID NO: 8284 0.04% 2.5 5 170 SEQ ID NO: 8285 0.04% 2.5 6 99 SEQ ID NO: 8286 0.04% 2.25 7 188 SEQ ID NO: 8287 0.02% 1.35 8 180 SEQ ID NO: 8288 0.02% 1.25 9 219 SEQ ID NO: 8289 0.02% 1.25 10 18 SEQ ID NO: 8290 0.01% 1 11 226 SEQ ID NO: 8291 0.01% 1 12 98 SEQ ID NO: 8292 0.01% 0.625 13 151 SEQ ID NO: 8293 0.01% 0.625 14 10 SEQ ID NO: 8294 0.01% 0.6 15 13 SEQ ID NO: 8295 0.00% 0.5 16 32 SEQ ID NO: 8296 0.00% 0.5 17 70 SEQ ID NO: 8297 0.00% 0.5 18 78 SEQ ID NO: 8298 0.00% 0.5 19 82 SEQ ID NO: 8299 0.00% 0.5 20 145 SEQ ID NO: 8300 0.00% 0.5 HLA A1-10 mers Максимально возможная оценка с использованием этой молекулы типа 5625 1 99 SEQ ID NO: 8301 0.8% 45 2 223 SEQ ID NO: 8302 0.8% 45 3 188 SEQ ID NO: 8303 0.48% 27 4 206 SEQ ID NO: 8304 0.2% 11.25 5 253 SEQ ID NO: 8305 0.17% 10 6 174 SEQ ID NO: 8306 0.13% 7.5 7 97 SEQ ID NO: 8307 0.04% 2.5 8 257 SEQ ID NO: 8308 0.04% 2.5 9 179 SEQ ID NO: 8309 0.04% 2.25 10 162 SEQ ID NO: 8310 0.02% 1.25 11 196 SEQ ID NO: 8311 0.02% 1.25 12 219 SEQ ID NO: 8312 0.02% 1.25 13 18 SEQ ID NO: 8313 0.01% 1 14 246 SEQ ID NO: 8314 0.01% 1 15 38 SEQ ID NO: 8315 0.01% 0.75 16 33 SEQ ID NO: 8316 0.00% 0.5 17 69 SEQ ID NO: 8317 0.00% 0.5 18 81 SEQ ID NO: 8318 0.00% 0.5 19 104 SEQ ID NO: 8319 0.00% 0.5 20 116 SEQ ID NO: 8320 0.00% 0.5 HLA A3-9 mers Максимально возможная оценка с использованием этой молекулы типа 12150 1 104 SEQ ID NO: 8321 0.98% 120 2 123 SEQ ID NO: 8322 0.74% 90 3 82 SEQ ID NO: 8323 0.44% 54 4 106 SEQ ID NO: 8324 0.11% 13.5 5 99 SEQ ID NO: 8325 0.08% 10.8 6 127 SEQ ID NO: 8326 0.08% 10 7 71 SEQ ID NO: 8327 0.07% 9 8 1 SEQ ID NO: 8328 0.06% 8.1 9 113 SEQ ID NO: 8329 0.04% 6 10 84 SEQ ID NO: 8330 0.03% 4.5 11 109 SEQ ID NO: 8331 0.03% 4.05 12 58 SEQ ID NO: 8332 0.02% 3 13 138 SEQ ID NO: 8333 0.02% 3 14 44 SEQ ID NO: 8334 0.02% 2.7 15 81 SEQ ID NO: 8335 0.02% 2.7 16 226 SEQ ID NO: 8336 0.02% 2.7 17 184 SEQ ID NO: 8337 0.01% 1.8 18 102 SEQ ID NO: 8338 0.01% 1.215 19 39 SEQ ID NO: 8339 0.00% 1.2 20 234 SEQ ID NO: 8340 0.00% 0.9 HLA A3-10 mers Максимально возможная оценка с использованием этой молекулы типа 12150 1 99 SEQ ID NO: 8341 1.33% 162 2 81 SEQ ID NO: 8342 0.44% 54 3 104 SEQ ID NO: 8343 0.24% 30 4 51 SEQ ID NO: 8344 0.16% 20 5 122 SEQ ID NO: 8345 0.11% 13.5 6 71 SEQ ID NO: 8346 0.07% 9 7 69 SEQ ID NO: 8347 0.04% 6 8 223 SEQ ID NO: 8348 0.04% 5.4 9 84 SEQ ID NO: 8349 0.03% 4.5 10 63 SEQ ID NO: 8350 0.02% 3.6 11 138 SEQ ID NO: 8351 0.02% 3 12 201 SEQ ID NO: 8352 0.01% 1.8 13 44 SEQ ID NO: 8353 0.01% 1.35 14 83 SEQ ID NO: 8354 0.01% 1.35 15 116 SEQ ID NO: 8355 0.00% 1.2 16 46 SEQ ID NO: 8356 0.00% 0.9 17 183 SEQ ID NO: 8357 0.00% 0.81 18 57 SEQ ID NO: 8358 0.00% 0.6 19 93 SEQ ID NO: 8359 0.00% 0.6 20 113 SEQ ID NO: 8360 0.00% 0.6 HLA A24-9 mers Максимально возможная оценка с использованием этой молекулы типа 1596.672 1 198 SEQ ID NO: 8361 13.15% 210 2 105 SEQ ID NO: 8362 9.39% 150 3 210 SEQ ID NO: 8363 4.69% 75 4 75 SEQ ID NO: 8364 3.15% 50.4 5 85 SEQ ID NO: 8365 2.63% 42 6 205 SEQ ID NO: 8366 2.10% 33.6 7 77 SEQ ID NO: 8367 1.87% 30 8 158 SEQ ID NO: 8368 0.65% 10.5 9 103 SEQ ID NO: 8369 0.56% 9 10 227 SEQ ID NO: 8370 0.55% 8.8704 11 32 SEQ ID NO: 8371 0.54% 8.64 12 74 SEQ ID NO: 8372 0.50% 8 13 131 SEQ ID NO: 8373 0.50% 8 14 54 SEQ ID NO: 8374 0.46% 7.5 15 99 SEQ ID NO: 8375 0.45% 7.2 16 44 SEQ ID NO: 8376 0.37% 6 17 62 SEQ ID NO: 8377 0.37% 6 18 87 SEQ ID NO: 8378 0.37% 6 19 89 SEQ ID NO: 8379 0.37% 6 20 154 SEQ ID NO: 8380 0.37% 6 HLA A24-10 mers Максимально возможная оценка с использованием этой молекулы типа 1596.672 1 105 SEQ ID NO: 8381 22.54% 360 2 204 SEQ ID NO: 8382 17.53% 280 3 209 SEQ ID NO: 8383 3.13% 50 4 75 SEQ ID NO: 8384 1.87% 30 5 85 SEQ ID NO: 8385 1.87% 30 6 77 SEQ ID NO: 8386 1.12% 18 7 74 SEQ ID NO: 8387 0.84% 13.44 8 210 SEQ ID NO: 8388 0.56% 9 9 226 SEQ ID NO: 8389 0.55% 8.8704 10 98 SEQ ID NO: 8390 0.54% 8.64 11 198 SEQ ID NO: 8391 0.46% 7.5 12 67 SEQ ID NO: 8392 0.45% 7.2 13 152 SEQ ID NO: 8393 0.43% 7 14 43 SEQ ID NO: 8394 0.37% 6 15 63 SEQ ID NO: 8395 0.37% 6 16 72 SEQ ID NO: 8396 0.37% 6 17 89 SEQ ID NO: 8397 0.37% 6 18 101 SEQ ID NO: 8398 0.37% 6 19 107 SEQ ID NO: 8399 0.37% 6 20 111 SEQ ID NO: 8400 0.37% 6 HLA A 0201-9 mers Максимально возможная оценка с использованием этой молекулы типа 3925227.1 1 138 SEQ ID NO: 8401 0.21% 8532.082944 2 106 SEQ ID NO: 8402 0.10% 3977.8497792 3 44 SEQ ID NO: 8403 0.03% 1243.078056 4 71 SEQ ID NO: 8404 0.00% 348.872832 5 234 SEQ ID NO: 8405 0.00% 243.432 6 51 SEQ ID NO: 8406 0.00% 130.26096 7 109 SEQ ID NO: 8407 0.00% 91.182672 8 81 SEQ ID NO: 8408 0.00% 73.342584 9 88 SEQ ID NO: 8409 0.00% 70.386624 10 1 SEQ ID NO: 8410 0.00% 65.32728732 11 38 SEQ ID NO: 8411 0.00% 47.876409 12 76 SEQ ID NO: 8412 0.00% 36.8637882 13 46 SEQ ID NO: 8413 0.00% 30.889782 14 211 SEQ ID NO: 8414 0.00% 21.616753941 15 201 SEQ ID NO: 8415 0.00% 19.657134 16 102 SEQ ID NO: 8416 0.00% 18.4318941 17 199 SEQ ID NO: 8417 0.00% 16.496865 18 74 SEQ ID NO: 8418 0.00% 15.783256167 19 62 SEQ ID NO: 8419 0.00% 13.9968225 20 99 SEQ ID NO: 8420 0.00% 10.31851392 HLA A 0201-10 mers Максимально возможная оценка с использованием этой молекулы типа 3925227.1 1 78 SEQ ID NO: 8421 0.01% 556.494246 2 138 SEQ ID NO: 8422 0.01% 395.245972224 3 84 SEQ ID NO: 8423 0.00% 201.554244 4 71 SEQ ID NO: 8424 0.00% 143.65707264 5 44 SEQ ID NO: 8425 0.00% 132.54624 6 76 SEQ ID NO: 8426 0.00% 84.78671286 7 8 SEQ ID NO: 8427 0.00% 69.552 8 211 SEQ ID NO: 8428 0.00% 52.7237901 9 113 SEQ ID NO: 8429 0.00% 47.99088 10 61 SEQ ID NO: 8430 0.00% 37.4509575 11 93 SEQ ID NO: 8431 0.00% 31.24872 12 137 SEQ ID NO: 8432 0.00% 31.1384304 13 37 SEQ ID NO: 8433 0.00% 27.531 14 55 SEQ ID NO: 8434 0.00% 22.9153278 15 98 SEQ ID NO: 8435 0.00% 22.1063618985 16 108 SEQ ID NO: 8436 0.00% 21.55457052 17 63 SEQ ID NO: 8437 0.00% 21.3624 18 45 SEQ ID NO: 8438 0.00% 19.657134 19 200 SEQ ID NO: 8439 0.00% 19.657134 20 104 SEQ ID NO: 8440 0.00% 13.87622016 HLA A 1101-9 mers Максимально возможная оценка с использованием этой молекулы тип 36 1 58 SEQ ID NO: 8441 5.55% 2 2 125 SEQ ID NO: 8442 1.66% 0.6 3 226 SEQ ID NO: 8443 1.66% 0.6 4 229 SEQ ID NO: 8444 1.66% 0.6 HLA A 1101-10 mers Максимально возможная оценка с использованием этой молекулы тип 36 1 122 SEQ ID NO: 8445 2.22% 0.8 2 228 SEQ ID NO: 8446 2.22% 0.8 HLA B7-9 mers Максимально возможная оценка с использованием этой молекулы типа 5400 1 97 SEQ ID NO: 8447 0.66% 36 2 86 SEQ ID NO: 8448 0.37% 20 3 37 SEQ ID NO: 8449 0.33% 18 4 62 SEQ ID NO: 8450 0.33% 18 5 32 SEQ ID NO: 8451 0.22% 12 6 102 SEQ ID NO: 8452 0.22% 12 7 227 SEQ ID NO: 8453 0.22% 12 8 53 SEQ ID NO: 8454 0.11% 6 9 1 SEQ ID NO: 8455 0.07% 4 10 44 SEQ ID NO: 8456 0.07% 4 11 56 SEQ ID NO: 8457 0.07% 4 12 64 SEQ ID NO: 8458 0.07% 4 13 74 SEQ ID NO: 8459 0.07% 4 14 76 SEQ ID NO: 8460 0.07% 4 15 87 SEQ ID NO: 8461 0.07% 4 16 106 SEQ ID NO: 8462 0.07% 4 17 131 SEQ ID NO: 8463 0.07% 4 18 23 SEQ ID NO: 8464 0.03% 2 19 157 SEQ ID NO: 8465 0.03% 2 20 166 SEQ ID NO: 8466 0.03% 2 HLA B7-10 mers Максимально возможная оценка с использованием этой молекулы типа 5400 1 119 SEQ ID NO: 8467 3.33% 180 2 264 SEQ ID NO: 8468 1.48% 80 3 98 SEQ ID NO: 8469 0.66% 36 4 27 SEQ ID NO: 8470 0.37% 20 5 86 SEQ ID NO: 8471 0.37% 20 6 31 SEQ ID NO: 8472 0.22% 12 7 63 SEQ ID NO: 8473 0.22% 12 8 96 SEQ ID NO: 8474 0.22% 12 9 101 SEQ ID NO: 8475 0.22% 12 10 226 SEQ ID NO: 8476 0.22% 12 11 157 SEQ ID NO: 8477 0.14% 8 12 176 SEQ ID NO: 8478 0.14% 8 13 238 SEQ ID NO: 8479 0.14% 8 14 36 SEQ ID NO: 8480 0.11% 6 15 53 SEQ ID NO: 8481 0.11% 6 16 61 SEQ ID NO: 8482 0.11% 6 17 3 SEQ ID NO: 8483 0.07% 4 18 40 SEQ ID NO: 8484 0.07% 4 19 55 SEQ ID NO: 8485 0.07% 4 20 74 SEQ ID NO: 8486 0.07% 4

[1678] ТАБЛИЦА-США-00082 Таблица 18 Эпитопы для SEQ ID нет: 6044 Начало % от макс. Ранг позиция последовательность оценка оценка HLA A1-9 mers Максимально возможная оценка с использованием этой молекулы типа 5625 1 69 SEQ ID NO: 8487 0.04% 2.5 2 89 SEQ ID NO: 8488 0.02% 1.5 3 141 SEQ ID NO: 8489 0.01% 1 4 113 SEQ ID NO: 8490 0.00% 0.5 HLA A1-10 mers Максимально возможная оценка с использованием этой молекулы типа 5625 1 21 SEQ ID NO: 8491 0.02% 1.5 2 88 SEQ ID NO: 8492 0.02% 1.5 3 8 SEQ ID NO: 8493 0.02% 1.25 4 31 SEQ ID NO: 8494 0.00% 0.5 5 112 SEQ ID NO: 8495 0.00% 0.5 HLA A3-9 mers Максимально возможная оценка с использованием этой молекулы типа 12150 1 60 SEQ ID NO: 8496 1.23% 150 2 77 SEQ ID NO: 8497 1.11% 135 3 141 SEQ ID NO: 8498 0.49% 60 4 95 SEQ ID NO: 8499 0.32% 40 5 128 SEQ ID NO: 8500 0.08% 10 6 113 SEQ ID NO: 8501 0.04% 6 7 69 SEQ ID NO: 8502 0.01% 2 8 22 SEQ ID NO: 8503 0.01% 1.8 9 42 SEQ ID NO: 8504 0.01% 1.8 10 78 SEQ ID NO: 8505 0.00% 1.2 11 32 SEQ ID NO: 8506 0.00% 1 12 54 SEQ ID NO: 8507 0.00% 0.9 13 74 SEQ ID NO: 8508 0.00% 0.9 14 28 SEQ ID NO: 8509 0.00% 0.6 15 36 SEQ ID NO: 8510 0.00% 0.6 16 48 SEQ ID NO: 8511 0.00% 0.6 17 118 SEQ ID NO: 8512 0.00% 0.6 18 4 SEQ ID NO: 8513 0.00% 0.5 HLA A3-10 mers Максимально возможная оценка с использованием этой молекулы типа 12150 1 94 SEQ ID NO: 8514 0.49% 60 2 48 SEQ ID NO: 8515 0.16% 20 3 128 SEQ ID NO: 8516 0.16% 20 4 60 SEQ ID NO: 8517 0.12% 15 5 127 SEQ ID NO: 8518 0.12% 15 6 25 SEQ ID NO: 8519 0.04% 6 7 95 SEQ ID NO: 8520 0.04% 6 8 141 SEQ ID NO: 8521 0.04% 6 9 41 SEQ ID NO: 8522 0.04% 5.4 10 77 SEQ ID NO: 8523 0.04% 5.4 11 116 SEQ ID NO: 8524 0.04% 5.4 12 91 SEQ ID NO: 8525 0.03% 4 13 4 SEQ ID NO: 8526 0.01% 2 14 112 SEQ ID NO: 8527 0.01% 1.8 15 113 SEQ ID NO: 8528 0.01% 1.35 16 12 SEQ ID NO: 8529 0.00% 1.2 17 31 SEQ ID NO: 8530 0.00% 1 18 32 SEQ ID NO: 8531 0.00% 1 19 15 SEQ ID NO: 8532 0.00% 0.9 20 27 SEQ ID NO: 8533 0.00% 0.9 HLA A24-9 mers Максимально возможная оценка с использованием этой молекулы типа 1596.672 1 61 SEQ ID NO: 8534 14.46% 231 2 16 SEQ ID NO: 8535 3.13% 50 3 120 SEQ ID NO: 8536 1.87% 30 4 41 SEQ ID NO: 8537 0.60% 9.6 5 71 SEQ ID NO: 8538 0.45% 7.2 6 21 SEQ ID NO: 8539 0.37% 6 7 53 SEQ ID NO: 8540 0.37% 6 8 65 SEQ ID NO: 8541 0.37% 6 9 121 SEQ ID NO: 8542 0.37% 6 10 74 SEQ ID NO: 8543 0.36% 5.76 11 20 SEQ ID NO: 8544 0.35% 5.6 12 79 SEQ ID NO: 8545 0.35% 5.6 13 105 SEQ ID NO: 8546 0.33% 5.28 14 48 SEQ ID NO: 8547 0.30% 4.8 15 88 SEQ ID NO: 8548 0.30% 4.8 16 106 SEQ ID NO: 8549 0.30% 4.8 17 37 SEQ ID NO: 8550 0.27% 4.4 18 70 SEQ ID NO: 8551 0.27% 4.4 19 18 SEQ ID NO: 8552 0.25% 4 20 57 SEQ ID NO: 8553 0.22% 3.6 HLA A24-10 mers Максимально возможная оценка с использованием этой молекулы типа 1596.672 1 120 SEQ ID NO: 8554 1.87% 30 2 73 SEQ ID NO: 8555 0.54% 8.64 3 19 SEQ ID NO: 8556 0.52% 8.4 4 78 SEQ ID NO: 8557 0.52% 8.4 5 104 SEQ ID NO: 8558 0.49% 7.92 6 61 SEQ ID NO: 8559 0.46% 7.5 7 47 SEQ ID NO: 8560 0.45% 7.2 8 36 SEQ ID NO: 8561 0.41% 6.6 9 52 SEQ ID NO: 8562 0.37% 6 10 64 SEQ ID NO: 8563 0.30% 4.8 11 70 SEQ ID NO: 8564 0.30% 4.8 12 105 SEQ ID NO: 8565 0.30% 4.8 13 123 SEQ ID NO: 8566 0.30% 4.8 14 69 SEQ ID NO: 8567 0.27% 4.4 15 20 SEQ ID NO: 8568 0.25% 4 16 66 SEQ ID NO: 8569 0.25% 4 17 83 SEQ ID NO: 8570 0.25% 4 18 86 SEQ ID NO: 8571 0.25% 4 19 101 SEQ ID NO: 8572 0.25% 4 20 119 SEQ ID NO: 8573 0.25% 4 HLA A 0201-9 mers Максимально возможная оценка с использованием этой молекулы типа 3925227.1 1 62 SEQ ID NO: 8574 0.00% 136.1646 2 85 SEQ ID NO: 8575 0.00% 69.6969 3 47 SEQ ID NO: 8576 0.00% 60.153786 4 121 SEQ ID NO: 8577 0.00% 52.5182736 5 74 SEQ ID NO: 8578 0.00% 49.13352 6 23 SEQ ID NO: 8579 0.00% 21.99582 7 78 SEQ ID NO: 8580 0.00% 19.42488 8 114 SEQ ID NO: 8581 0.00% 14.6900655 9 4 SEQ ID NO: 8582 0.00% 11.304684 10 79 SEQ ID NO: 8583 0.00% 8.4687081 11 122 SEQ ID NO: 8584 0.00% 06.0996 12 100 SEQ ID NO: 8585 0.00% 5.382 13 105 SEQ ID NO: 8586 0.00% 4.981593 14 25 SEQ ID NO: 8587 0.00% 4.968 15 115 SEQ ID NO: 8588 0.00% 4.966482 16 24 SEQ ID NO: 8589 0.00% 4.4815221585 17 111 SEQ ID NO: 8590 0.00% 4.128201 18 94 SEQ ID NO: 8591 0.00% 3.67632

19 34 SEQ ID NO: 8592 0.00% 3.47553 20 12 SEQ ID NO: 8593 0.00% 3.30993 HLA A 0201-10 mers Максимально возможная оценка с использованием этой молекулы типа 3925227.1 1 77 SEQ ID NO: 8594 0.00% 147.97188 2 62 SEQ ID NO: 8595 0.00% 143.59176 3 113 SEQ ID NO: 8596 0.00% 106.83684 4 78 SEQ ID NO: 8597 0.00% 83.526984 5 86 SEQ ID NO: 8598 0.00% 83.526984 6 74 SEQ ID NO: 8599 0.00% 69.552 7 121 SEQ ID NO: 8600 0.00% 61.06776 8 12 SEQ ID NO: 8601 0.00% 50.232 9 44 SEQ ID NO: 8602 0.00% 26.082 10 4 SEQ ID NO: 8603 0.00% 18.3816 11 0 SEQ ID NO: 8604 0.00% 17.38386 12 72 SEQ ID NO: 8605 0.00% 17.1396 13 22 SEQ ID NO: 8606 0.00% 16.21914 14 122 SEQ ID NO: 8607 0.00% 14.02908 15 64 SEQ ID NO: 8608 0.00% 11.161854 16 46 SEQ ID NO: 8609 0.00% 10.34586 17 54 SEQ ID NO: 8610 0.00% 8.846145 18 47 SEQ ID NO: 8611 0.00% 7.575080337 19 131 SEQ ID NO: 8612 0.00% 7.452 20 114 SEQ ID NO: 8613 0.00% 6.735366 HLA A 1101-9 mers Максимально возможная оценка с использованием этой молекулы тип 36 1 69 SEQ ID NO: 8614 5.55% 2 2 22 SEQ ID NO: 8615 5% 1.8 3 77 SEQ ID NO: 8616 5% 1.8 4 141 SEQ ID NO: 8617 3.33% 1.2 5 60 SEQ ID NO: 8618 2.22% 0.8 6 95 SEQ ID NO: 8619 2.22% 0.8 7 36 SEQ ID NO: 8620 1.66% 0.6 HLA A 1101-10 mers Максимально возможная оценка с использованием этой молекулы тип 36 1 41 SEQ ID NO: 8621 3.33% 1.2 2 68 SEQ ID NO: 8622 33.33% 1.2 3 94 SEQ ID NO: 8623 3.33% 1.2 4 31 SEQ ID NO: 8624 2.77% 1 5 127 SEQ ID NO: 8625 2.5% 0.9 HLA B7-9 mers Максимально возможная оценка с использованием этой молекулы типа 5400 1 48 SEQ ID NO: 8626 0.74% 40 2 20 SEQ ID NO: 8627 0.37% 20 3 121 SEQ ID NO: 8628 0.33% 18 4 18 SEQ ID NO: 8629 0.07% 4 5 21 SEQ ID NO: 8630 0.07% 4 6 37 SEQ ID NO: 8631 0.07% 4 7 41 SEQ ID NO: 8632 0.07% 4 8 53 SEQ ID NO: 8633 0.07% 4 9 65 SEQ ID NO: 8634 0.07% 4 10 70 SEQ ID NO: 8635 0.07% 4 11 71 SEQ ID NO: 8636 0.07% 4 12 74 SEQ ID NO: 8637 0.07% 4 13 79 SEQ ID NO: 8638 0.07% 4 14 88 SEQ ID NO: 8639 0.07% 4 15 105 SEQ ID NO: 8640 0.07% 4 16 106 SEQ ID NO: 8641 0.07% 4 17 124 SEQ ID NO: 8642 0.07% 4 18 1 SEQ ID NO: 8643 0.03% 2 19 120 SEQ ID NO: 8644 0.03% 1.8 20 11 SEQ ID NO: 8645 0.02% 1.2 HLA B7-10 mers Максимально возможная оценка с использованием этой молекулы типа 5400 1 63 SEQ ID NO: 8646 1.48% 80 2 123 SEQ ID NO: 8647 0.74% 40 3 20 SEQ ID NO: 8648 0.37% 20 4 64 SEQ ID NO: 8649 0.22% 12 5 119 SEQ ID NO: 8650 0.11% 6 6 54 SEQ ID NO: 8651 0.09% 5 7 19 SEQ ID NO: 8652 0.07% 4 8 36 SEQ ID NO: 8653 0.07% 4 9 47 SEQ ID NO: 8654 0.07% 4 10 52 SEQ ID NO: 8655 0.07% 4 11 69 SEQ ID NO: 8656 0.07% 4 12 70 SEQ ID NO: 8657 0.07% 4 13 73 SEQ ID NO: 8658 0.07% 4 14 78 SEQ ID NO: 8659 0.07% 4 15 83 SEQ ID NO: 8660 0.07% 4 16 86 SEQ ID NO: 8661 0.07% 4 17 101 SEQ ID NO: 8662 0.07% 4 18 104 SEQ ID NO: 8663 0.07% 4 19 105 SEQ ID NO: 8664 0.07% 4 20 15 SEQ ID NO: 8665 0.03% 2

[1679] ТАБЛИЦА-США-00083 Таблица 19 Эпитопы для SEQ ID нет: 6045 Начало % от макс. Ранг позиция последовательность оценка оценка HLA A1-9 mers Максимально возможная оценка с использованием этой молекулы типа 5625 1 4 SEQ ID NO: 8666 0.02% 1.35 2 66 SEQ ID NO: 8667 0.02% 1.35 3 33 SEQ ID NO: 8668 0.02% 1.25 4 44 SEQ ID NO: 8669 0.01% 1 5 50 SEQ ID NO: 8670 0.01% 1 6 14 SEQ ID NO: 8671 0.01% 0.75 7 48 SEQ ID NO: 8672 0.01% 0.75 8 11 SEQ ID NO: 8673 0.00% 0.5 HLA A1-10 mers Максимально возможная оценка с использованием этой молекулы типа 5625 1 4 SEQ ID NO: 8674 0.12% 6.75 2 66 SEQ ID NO: 8675 0.12% 6.75 3 10 SEQ ID NO: 8676 0.00% 0.5 4 28 SEQ ID NO: 8677 0.00% 0.5 5 32 SEQ ID NO: 8678 0.00% 0.5 6 47 SEQ ID NO: 8679 0.00% 0.5 HLA A3-9 mers Максимально возможная оценка с использованием этой молекулы типа 12150 1 17 SEQ ID NO: 8680 0.24% 30 2 44 SEQ ID NO: 8681 0.07% 9 3 19 SEQ ID NO: 8682 0.06% 8.1 4 50 SEQ ID NO: 8683 0.04% 5.4 5 29 SEQ ID NO: 8684 0.03% 4 6 52 SEQ ID NO: 8685 0.02% 3.24 7 54 SEQ ID NO: 8686 0.02% 3 8 11 SEQ ID NO: 8687 0.01% 1.8 9 37 SEQ ID NO: 8688 0.01% 1.8 10 25 SEQ ID NO: 8689 0.01% 1.35 11 10 SEQ ID NO: 8690 0.00% 0.9 12 16 SEQ ID NO: 8691 0.00% 0.9 13 35 SEQ ID NO: 8692 0.00% 0.6 HLA A3-10 mers Максимально возможная оценка с использованием этой молекулы типа 12150 1 49 SEQ ID NO: 8693 0.44% 54 2 17 SEQ ID NO: 8694 0.22% 27 3 10 SEQ ID NO: 8695 0.14% 18 4 16 SEQ ID NO: 8696 0.07% 9 5 32 SEQ ID NO: 8697 0.04% 6 6 19 SEQ ID NO: 8698 0.01% 1.8 7 29 SEQ ID NO: 8699 0.00% 1.2 8 23 SEQ ID NO: 8700 0.00% 0.9 9 26 SEQ ID NO: 8701 0.00% 0.9 HLA A24-9 mers Максимально возможная оценка с использованием этой молекулы типа 1596.672 1 18 SEQ ID NO: 8702 1.87% 30 2 24 SEQ ID NO: 8703 0.65% 10.5 3 9 SEQ ID NO: 8704 0.52% 8.4 4 12 SEQ ID NO: 8705 0.52% 8.4 5 28 SEQ ID NO: 8706 0.52% 8.4 6 42 SEQ ID NO: 8707 0.52% 8.4 7 57 SEQ ID NO: 8708 0.52% 8.4 8 66 SEQ ID NO: 8709 0.52% 8.4 9 55 SEQ ID NO: 8710 0.51% 8.25 10 0 SEQ ID NO: 8711 0.48% 7.7 11 22 SEQ ID NO: 8712 0.45% 7.2 12 10 SEQ ID NO: 8713 0.37% 6 13 25 SEQ ID NO: 8714 0.37% 6 14 30 SEQ ID NO: 8715 0.37% 6 15 19 SEQ ID NO: 8716 0.35% 5.6 16 40 SEQ ID NO: 8717 0.31% 5 17 3 SEQ ID NO: 8718 0.30% 4.8 18 65 SEQ ID NO: 8719 0.30% 4.8 19 14 SEQ ID NO: 8720 0.27% 4.32 20 56 SEQ ID NO: 8721 0.25% 4 HLA A24-10 mers Максимально возможная оценка с использованием этой молекулы типа 1596.672 1 55 SEQ ID NO: 8722 18.78% 300 2 18 SEQ ID NO: 8723 2.63% 42 3 21 SEQ ID NO: 8724 2.25% 36 4 2 SEQ ID NO: 8725 1.87% 30 5 24 SEQ ID NO: 8726 1.87% 30 6 11 SEQ ID NO: 8727 0.52% 8.4 7 40 SEQ ID NO: 8728 0.52% 8.4 8 65 SEQ ID NO: 8729 0.42% 6.72 9 9 SEQ ID NO: 8730 0.37% 6 10 8 SEQ ID NO: 8731 0.35% 5.6 11 27 SEQ ID NO: 8732 0.35% 5.6 12 41 SEQ ID NO: 8733 0.35% 5.6 13 57 SEQ ID NO: 8734 0.31% 5 14 17 SEQ ID NO: 8735 0.25% 4 15 29 SEQ ID NO: 8736 0.25% 4 16 64 SEQ ID NO: 8737 0.25% 4 17 16 SEQ ID NO: 8738 0.22% 3.6 18 10 SEQ ID NO: 8739 0.18% 3 19 13 SEQ ID NO: 8740 0.18% 2.88 20 23 SEQ ID NO: 8741 0.08% 1.4 HLA A 0201-9 mers Максимально возможная оценка с использованием этой молекулы типа 3925227.1 1 19 SEQ ID NO: 8742 0.03% 1310.8823136 2 15 SEQ ID NO: 8743 0.02% 1082.4143022 3 16 SEQ ID NO: 8744 0.02% 1040.33238624 4 49 SEQ ID NO: 8745 0.00% 382.536 5 25 SEQ ID NO: 8746 0.00% 342.863529264 6 56 SEQ ID NO: 8747 0.00% 63.28397376 7 12 SEQ ID NO: 8748 0.00% 40.19736105 8 10 SEQ ID NO: 8749 0.00% 21.3624 9 22 SEQ ID NO: 8750 0.00% 19.7762418 10 26 SEQ ID NO: 8751 0.00% 12.6684 11 20 SEQ ID NO: 8752 0.00% 11.544666 12 37 SEQ ID NO: 8753 0.00% 10.4328 13 32 SEQ ID NO: 8754 0.00% 8.4456 14 23 SEQ ID NO: 8755 0.00% 6.2888049 15 47 SEQ ID NO: 8756 0.00% 6.0858 16 3 SEQ ID NO: 8757 0.00% 4.582929078 17 18 SEQ ID NO: 8758 0.00% 4.4855150505 18 28 SEQ ID NO: 8759 0.00% 4.2923589 19 62 SEQ ID NO: 8760 0.00% 2.88098391 20 27 SEQ ID NO: 8761 0.00% 1.699677 HLA A 0201-10 mers Максимально возможная оценка с использованием этой молекулы типа 3925227.1 1 17 SEQ ID NO: 8762 0.16% 6459.14167272 2 19 SEQ ID NO: 8763 0.01% 607.88448 3 25 SEQ ID NO: 8764 0.00% 126.83304 4 11 SEQ ID NO: 8765 0.00% 63.16728165 5 15 SEQ ID NO: 8766 0.00% 53.54651988 6 37 SEQ ID NO: 8767 0.00% 28.51632 7 14 SEQ ID NO: 8768 0.00% 21.8247414 8 29 SEQ ID NO: 8769 0.00% 21.3624 9 26 SEQ ID NO: 8770 0.00% 19.42488 10 3 SEQ ID NO: 8771 0.00% 17.2167282 11 48 SEQ ID NO: 8772 0.00% 15.7068219 12 12 SEQ ID NO: 8773 0.00% 9.8581266 13 27 SEQ ID NO: 8774 0.00% 7.3086111 14 39 SEQ ID NO: 8775 0.00% 7.10976 15 23 SEQ ID NO: 8776 0.00% 5.7419523 16 22 SEQ ID NO: 8777 0.00% 4.599126 17 45 SEQ ID NO: 8778 0.00% 2.5495155 18 31 SEQ ID NO: 8779 0.00% 2.52747 19 52 SEQ ID NO: 8780 0.00% 2.383605 20 20 SEQ ID NO: 8781 0.00% 2.332847151 HLA A 1101-9 mers Максимально возможная оценка с использованием этой молекулы тип 36 1 44 SEQ ID NO: 8782 3.33% 1.2 HLA B7-9 mers Максимально возможная оценка с использованием этой молекулы типа 5400 HLA B7-9 mers Максимально возможная оценка с использованием этой молекулы типа 5400 1 3 SEQ ID NO: 8783 0.37% 20 2 12 SEQ ID NO: 8784 0.37% 20 3 22 SEQ ID NO: 8785 0.37% 20 4 56 SEQ ID NO: 8786 0.37% 20 5 30 SEQ ID NO: 8787 0.22% 12 6 9 SEQ ID NO: 8788 0.07% 4 7 10 SEQ ID NO: 8789 0.07% 4 8 19 SEQ ID NO: 8790 0.07% 4 9 25 SEQ ID NO: 8791 0.07% 4 10 28 SEQ ID NO: 8792 0.07% 4 11 42 SEQ ID NO: 8793 0.07% 4 12 65 SEQ ID NO: 8794 0.07% 4 13 35 SEQ ID NO: 8795 0.05% 3 14 66 SEQ ID NO: 8796 0.02% 1.2 15 15 SEQ ID NO: 8797 0.01% 1 16 47 SEQ ID NO: 8798 0.01% 1 17 20 SEQ ID NO: 8799 0.01% 0.6 18 23 SEQ ID NO: 8800 0.00% 0.5 19 27 SEQ ID NO: 8801 0.00% 0.5 HLA B7-10 mers Максимально возможная оценка с использованием этой молекулы типа 5400 1 27 SEQ ID NO: 8802 0.37% 20 2 8 SEQ ID NO: 8803 0.07% 4 3 9 SEQ ID NO: 8804 0.07% 4 4 11 SEQ ID NO: 8805 0.07% 4 5 17 SEQ ID NO: 8806 0.07% 4 6 29 SEQ ID NO: 8807 0.07% 4 7 41 SEQ ID NO: 8808 0.07% 4 8 52 SEQ ID NO: 8809 0.07% 4 9 64 SEQ ID NO: 8810 0.07% 4 10 65 SEQ ID NO: 8811 0.07% 4 11 3 SEQ ID NO: 8812 0.03% 2 12 23 SEQ ID NO: 8813 0.03% 2 13 21 SEQ ID NO: 8814 0.02% 1.2 14 15 SEQ ID NO: 8815 0.01% 1 15 35 SEQ ID NO: 8816 0.01% 0.6 16 39 SEQ ID NO: 8817 0.01% 0.6 17 12 SEQ ID NO: 8818 0.00% 0.5 18 22 SEQ ID NO: 8819 0.00% 0.5 19 45 SEQ ID NO: 8820 0.00% 0.5

[1680] ТАБЛИЦА-US-00084 Таблица 20 Эпитопы для SEQ ID нет: 6046 Начало % от макс. Ранг позиция последовательность оценка оценка HLA A1-9 mers Максимально возможная оценка с использованием этой молекулы типа 5625 1 186 SEQ ID NO: 8821 2.22% 125 2 156 SEQ ID NO: 8822 0.88% 50 3 14 SEQ ID NO: 8823 0.08% 4.5 4 0 SEQ ID NO: 8824 0.04% 2.5 5 29 SEQ ID NO: 8825 0.04% 2.5 6 85 SEQ ID NO: 8826 0.04% 2.5 7 168 SEQ ID NO: 8827 0.04% 2.5 8 133 SEQ ID NO: 8828 0.02% 1.35 9 111 SEQ ID NO: 8829 0.02% 1.125 10 61 SEQ ID NO: 8830 0.01% 1 11 7 SEQ ID NO: 8831 0.01% 0.9 12 131 SEQ ID NO: 8832 0.01% 0.9 13 211 SEQ ID NO: 8833 0.01% 0.625 14 4 SEQ ID NO: 8834 0.00% 0.5 15 43 SEQ ID NO: 8835 0.00% 0.5 16 95 SEQ ID NO: 8836 0.00% 0.5 17 136 SEQ ID NO: 8837 0.00% 0.5 HLA A1-10 mers Максимально возможная оценка с использованием этой молекулы типа 5625 1 133 SEQ ID NO: 8838 0.04% 2.7 2 84 SEQ ID NO: 8839 0.04% 2.5 3 167 SEQ ID NO: 8840 0.04% 2.5 4 186 SEQ ID NO: 8841 0.04% 2.5 5 131 SEQ ID NO: 8842 0.04% 2.25 6 14 SEQ ID NO: 8843 0.03% 1.8 7 205 SEQ ID NO: 8844 0.02% 1.25 8 111 SEQ ID NO: 8845 0.02% 1.125 9 60 SEQ ID NO: 8846 0.01% 1 10 188 SEQ ID NO: 8847 0.01% 0.75 11 211 SEQ ID NO: 8848 0.01% 0.625 12 26 SEQ ID NO: 8849 0.00% 0.5 13 94 SEQ ID NO: 8850 0.00% 0.5 14 135 SEQ ID NO: 8851 0.00% 0.5 15 168 SEQ ID NO: 8852 0.00% 0.5 HLA A3-9 mers Максимально возможная оценка с использованием этой молекулы типа 12150 1 43 SEQ ID NO: 8853 0.24% 30 2 90 SEQ ID NO: 8854 0.14% 18 3 148 SEQ ID NO: 8855 0.09% 12 4 4 SEQ ID NO: 8856 0.05% 6.75 5 24 SEQ ID NO: 8857 0.04% 6 6 19 SEQ ID NO: 8858 0.04% 5.4 7 136 SEQ ID NO: 8859 0.04% 5.4 8 54 SEQ ID NO: 8860 0.03% 4.5 9 32 SEQ ID NO: 8861 0.03% 4 10 14 SEQ ID NO: 8862 0.02% 3.6 11 59 SEQ ID NO: 8863 0.02% 3.6 12 88 SEQ ID NO: 8864 0.02% 3 13 87 SEQ ID NO: 8865 0.02% 2.7 14 29 SEQ ID NO: 8866 0.01% 1.8 15 48 SEQ ID NO: 8867 0.01% 1.8 16 115 SEQ ID NO: 8868 0.01% 1.8 17 186 SEQ ID NO: 8869 0.01% 1.8 18 106 SEQ ID NO: 8870 0.01% 1.5 19 53 SEQ ID NO: 8871 0.01% 1.35 20 173 SEQ ID NO: 8872 0.00% 1.2 HLA A3-10 mers Максимально возможная оценка с использованием этой молекулы типа 12150 1 24 SEQ ID NO: 8873 0.22% 27 2 54 SEQ ID NO: 8874 0.18% 22.5 3 135 SEQ ID NO: 8875 0.08% 10.8 4 51 SEQ ID NO: 8876 0.07% 9 5 13 SEQ ID NO: 8877 0.06% 8.1 6 26 SEQ ID NO: 8878 0.04% 6 7 31 SEQ ID NO: 8879 0.04% 6 8 90 SEQ ID NO: 8880 0.04% 6 9 43 SEQ ID NO: 8881 0.03% 4.5 10 19 SEQ ID NO: 8882 0.03% 4.05 11 169 SEQ ID NO: 8883 0.02% 3 12 87 SEQ ID NO: 8884 0.02% 2.7 13 84 SEQ ID NO: 8885 0.01% 1.8 14 88 SEQ ID NO: 8886 0.01% 1.8 15 94 SEQ ID NO: 8887 0.01% 1.8 16 64 SEQ ID NO: 8888 0.00% 1.2 17 131 SEQ ID NO: 8889 0.00% 1.2 18 99 SEQ ID NO: 8890 0.00% 1 19 53 SEQ ID NO: 8891 0.00% 0.9 20 85 SEQ ID NO: 8892 0.00% 0.9 HLA A24-9 mers Максимально возможная оценка с использованием этой молекулы типа 1596.672 1 196 SEQ ID NO: 8893 27.55% 440 2 44 SEQ ID NO: 8894 18.78% 300 3 36 SEQ ID NO: 8895 12.52% 200 4 92 SEQ ID NO: 8896 12.52% 200 5 109 SEQ ID NO: 8897 2.70%

43.2 6 25 SEQ ID NO: 8898 1.87% 30 7 93 SEQ ID NO: 8899 1.12% 18 8 12 SEQ ID NO: 8900 0.75% 12 9 123 SEQ ID NO: 8901 0.70% 11.2 10 7 SEQ ID NO: 8902 0.64% 10.368 11 17 SEQ ID NO: 8903 0.52% 8.4 12 139 SEQ ID NO: 8904 0.52% 8.4 13 193 SEQ ID NO: 8905 0.46% 7.5 14 6 SEQ ID NO: 8906 0.45% 7.2 15 19 SEQ ID NO: 8907 0.45% 7.2 16 110 SEQ ID NO: 8908 0.45% 7.2 17 114 SEQ ID NO: 8909 0.45% 7.2 18 210 SEQ ID NO: 8910 0.45% 7.2 19 46 SEQ ID NO: 8911 0.42% 6.72 20 52 SEQ ID NO: 8912 0.37% 6 HLA A24-10 mers Максимально возможная оценка с использованием этой молекулы типа 1596.672 1 92 SEQ ID NO: 8913 7.51% 120 2 42 SEQ ID NO: 8914 2.63% 42 3 109 SEQ ID NO: 8915 2.25% 36 4 23 SEQ ID NO: 8916 1.87% 30 5 34 SEQ ID NO: 8917 0.75% 12 6 6 SEQ ID NO: 8918 0.64% 10.368 7 45 SEQ ID NO: 8919 0.63% 10.08 8 196 SEQ ID NO: 8920 0.62% 10 9 44 SEQ ID NO: 8921 0.56% 9 10 40 SEQ ID NO: 8922 0.55% 8.8 11 62 SEQ ID NO: 8923 0.46% 7.5 12 193 SEQ ID NO: 8924 0.46% 7.5 13 18 SEQ ID NO: 8925 0.45% 7.2 14 113 SEQ ID NO: 8926 0.45% 7.2 15 56 SEQ ID NO: 8927 0.37% 6 16 176 SEQ ID NO: 8928 0.37% 6 17 16 SEQ ID NO: 8929 0.35% 5.6 18 138 SEQ ID NO: 8930 0.35% 5.6 19 127 SEQ ID NO: 8931 0.33% 5.28 20 36 SEQ ID NO: 8932 0.31% 5 HLA A 0201-9 mers Максимально возможная оценка с использованием этой молекулы типа 3925227.1 1 13 SEQ ID NO: 8933 0.04% 1793.676528 2 87 SEQ ID NO: 8934 0.03% 1415.3832 3 24 SEQ ID NO: 8935 0.01% 618.0996816 4 19 SEQ ID NO: 8936 0.00% 223.23708 5 12 SEQ ID NO: 8937 0.00% 210.36400875 6 51 SEQ ID NO: 8938 0.00% 198.30859992 7 53 SEQ ID NO: 8939 0.00% 194.477328 8 88 SEQ ID NO: 8940 0.00% 180.58536756 9 106 SEQ ID NO: 8941 0.00% 169.74828 10 54 SEQ ID NO: 8942 0.00% 70.09848 11 59 SEQ ID NO: 8943 0.00% 43.42032 12 94 SEQ ID NO: 8944 0.00% 41.792058 13 20 SEQ ID NO: 8945 0.00% 37.46088108 14 63 SEQ ID NO: 8946 0.00% 35.73520902 15 22 SEQ ID NO: 8947 0.00% 20.5916435109 16 47 SEQ ID NO: 8948 0.00% 12.233222865 17 66 SEQ ID NO: 8949 0.00% 12.2199 18 56 SEQ ID NO: 8950 0.00% 11.486706 19 67 SEQ ID NO: 8951 0.00% 6.416172 20 117 SEQ ID NO: 8952 0.00% 5.827464 HLA A 0201-10 mers Максимально возможная оценка с использованием этой молекулы типа 3925227.1 1 43 SEQ ID NO: 8953 0.10% 3977.8497792 2 24 SEQ ID NO: 8954 0.02% 836.2525104 3 51 SEQ ID NO: 8955 0.02% 815.616432 4 49 SEQ ID NO: 8956 0.01% 660.3245145 5 19 SEQ ID NO: 8957 0.00% 251.837856 6 59 SEQ ID NO: 8958 0.00% 159.9696 7 12 SEQ ID NO: 8959 0.00% 155.245377 8 45 SEQ ID NO: 8960 0.00% 141.1974531 9 21 SEQ ID NO: 8961 0.00% 117.22672269 10 53 SEQ ID NO: 8962 0.00% 84.55536 11 87 SEQ ID NO: 8963 0.00% 65.5671672 12 13 SEQ ID NO: 8964 0.00% 64.88888616 13 153 SEQ ID NO: 8965 0.00% 49.13352 14 178 SEQ ID NO: 8966 0.00% 26.082 15 18 SEQ ID NO: 8967 0.00% 24.802259691 16 116 SEQ ID NO: 8968 0.00% 21.5616168 17 65 SEQ ID NO: 8969 0.00% 20.77383 18 86 SEQ ID NO: 8970 0.00% 15.7068219 19 27 SEQ ID NO: 8971 0.00% 12.3159135 20 46 SEQ ID NO: 8972 0.00% 11.45624789925 HLA A 1101-9 mers Максимально возможная оценка с использованием этой молекулы тип 36 1 4 SEQ ID NO: 8973 12.5% 4.5 2 136 SEQ ID NO: 8974 3.33% 1.2 3 156 SEQ ID NO: 8975 3.33% 1.2 4 140 SEQ ID NO: 8976 1.66% 0.6 HLA A 1101-10 mers Максимально возможная оценка с использованием этой молекулы тип 36 1 169 SEQ ID NO: 8977 5.55% 2 2 94 SEQ ID NO: 8978 3.33% 1.2 HLA B7-9 mers Максимально возможная оценка с использованием этой молекулы типа 5400 1 146 SEQ ID NO: 8979 0.74% 40 2 154 SEQ ID NO: 8980 0.74% 40 3 80 SEQ ID NO: 8981 0.66% 36 4 139 SEQ ID NO: 8982 0.33% 18 5 83 SEQ ID NO: 8983 0.22% 12 6 209 SEQ ID NO: 8984 0.22% 12 7 7 SEQ ID NO: 8985 0.11% 6 8 3 SEQ ID NO: 8986 0.07% 4 9 6 SEQ ID NO: 8987 0.07% 4 10 12 SEQ ID NO: 8988 0.07% 4 11 19 SEQ ID NO: 8989 0.07% 4 12 24 SEQ ID NO: 8990 0.07% 4 13 38 SEQ ID NO: 8991 0.07% 4 14 46 SEQ ID NO: 8992 0.07% 4 15 56 SEQ ID NO: 8993 0.07% 4 16 110 SEQ ID NO: 8994 0.07% 4 17 114 SEQ ID NO: 8995 0.07% 4 18 123 SEQ ID NO: 8996 0.07% 4 19 129 SEQ ID NO: 8997 0.07% 4 20 166 SEQ ID NO: 8998 0.07% 4 HLA B7-10 mers Максимально возможная оценка с использованием этой молекулы типа 5400 1 56 SEQ ID NO: 8999 1.48% 80 2 40 SEQ ID NO: 9000 0.74% 40 3 127 SEQ ID NO: 9001 0.74% 40 4 170 SEQ ID NO: 9002 0.74% 40 5 140 SEQ ID NO: 9003 0.27% 15 6 35 SEQ ID NO: 9004 0.22% 12 7 79 SEQ ID NO: 9005 0.22% 12 8 82 SEQ ID NO: 9006 0.22% 12 9 208 SEQ ID NO: 9007 0.22% 12 10 209 SEQ ID NO: 9008 0.22% 12 11 80 SEQ ID NO: 9009 0.16% 9 12 129 SEQ ID NO: 9010 0.14% 8 13 138 SEQ ID NO: 9011 0.11% 6 14 73 SEQ ID NO: 9012 0.09% 5 15 2 SEQ ID NO: 9013 0.07% 4 16 5 SEQ ID NO: 9014 0.07% 4 17 6 SEQ ID NO: 9015 0.07% 4 18 16 SEQ ID NO: 9016 0.07% 4 19 18 SEQ ID NO: 9017 0.07% 4 20 24 SEQ ID NO: 9018 0.07% 4

[1681] ТАБЛИЦА-US-00085 Таблица 21 Эпитопы для SEQ ID нет: 6047 Начало % от макс. Ранг позиция последовательность оценка оценка HLA A1-9 mers Максимально возможная оценка с использованием этой молекулы типа 5625 1 53 SEQ ID NO: 9019 2% 112.5 2 10 SEQ ID NO: 9020 0.08% 4.5 3 33 SEQ ID NO: 9021 0.02% 1.5 4 3 SEQ ID NO: 9022 0.00% 0.5 5 27 SEQ ID NO: 9023 0.00% 0.5 6 29 SEQ ID NO: 9024 0.00% 0.5 HLA A1-10 mers Максимально возможная оценка с использованием этой молекулы типа 5625 1 10 SEQ ID NO: 9025 0.8% 45 2 52 SEQ ID NO: 9026 0.2% 11.25 3 50 SEQ ID NO: 9027 0.04% 2.5 4 32 SEQ ID NO: 9028 0.02% 1.5 5 48 SEQ ID NO: 9029 0.02% 1.35 6 27 SEQ ID NO: 9030 0.00% 0.5 HLA A3-9 mers Максимально возможная оценка с использованием этой молекулы типа 12150 1 38 SEQ ID NO: 9031 1.85% 225 2 17 SEQ ID NO: 9032 0.02% 3.6 3 2 SEQ ID NO: 9033 0.02% 2.7 4 37 SEQ ID NO: 9034 0.01% 1.8 5 27 SEQ ID NO: 9035 0.01% 1.35 6 13 SEQ ID NO: 9036 0.00% 0.675 7 14 SEQ ID NO: 9037 0.00% 0.6 HLA A3-10 mers Максимально возможная оценка с использованием этой молекулы типа 12150 1 13 SEQ ID NO: 9038 0.04% 6 2 37 SEQ ID NO: 9039 0.01% 2.025 3 2 SEQ ID NO: 9040 0.00% 0.9 4 19 SEQ ID NO: 9041 0.00% 0.675 5 16 SEQ ID NO: 9042 0.00% 0.54 HLA A24-9 mers Максимально возможная оценка с использованием этой молекулы типа 1596.672 1 20 SEQ ID NO: 9043 1.25% 20 2 6 SEQ ID NO: 9044 0.52% 8.4 3 5 SEQ ID NO: 9045 0.51% 8.25 4 35 SEQ ID NO: 9046 0.36% 5.76 5 31 SEQ ID NO: 9047 0.35% 5.6 6 43 SEQ ID NO: 9048 0.27% 4.4 7 13 SEQ ID NO: 9049 0.26% 4.2 8 32 SEQ ID NO: 9050 0.21% 3.36 9 2 SEQ ID NO: 9051 0.11% 1.8 10 9 SEQ ID NO: 9052 0.10% 1.68 11 8 SEQ ID NO: 9053 0.09% 1.5 12 15 SEQ ID NO: 9054 0.09% 1.5 13 23 SEQ ID NO: 9055 0.09% 1.5 14 27 SEQ ID NO: 9056 0.08% 1.4 15 24 SEQ ID NO: 9057 0.07% 1.2 16 7 SEQ ID NO: 9058 0.06% 1 17 17 SEQ ID NO: 9059 0.06% 1 18 10 SEQ ID NO: 9060 0.05% 0.9 19 39 SEQ ID NO: 9061 0.04% 0.792 20 47 SEQ ID NO: 9062 0.04% 0.792 HLA A24-10 mers Максимально возможная оценка с использованием этой молекулы типа 1596.672 1 5 SEQ ID NO: 9063 2.63% 42 2 34 SEQ ID NO: 9064 0.54% 8.64 3 30 SEQ ID NO: 9065 0.52% 8.4 4 19 SEQ ID NO: 9066 0.50% 8 5 50 SEQ ID NO: 9067 0.33% 5.28 6 12 SEQ ID NO: 9068 0.26% 4.2 7 31 SEQ ID NO: 9069 0.21% 3.36 8 26 SEQ ID NO: 9070 0.15% 2.52 9 8 SEQ ID NO: 9071 0.13% 2.1 10 22 SEQ ID NO: 9072 0.12% 2 11 23 SEQ ID NO: 9073 0.11% 1.8 12 6 SEQ ID NO: 9074 0.09% 1.5 13 14 SEQ ID NO: 9075 0.09% 1.5 14 16 SEQ ID NO: 9076 0.09% 1.5 15 7 SEQ ID NO: 9077 0.06% 1 16 48 SEQ ID NO: 9078 0.04% 0.75 17 0 SEQ ID NO: 9079 0.04% 0.72 18 9 SEQ ID NO: 9080 0.04% 0.72 19 47 SEQ ID NO: 9081 0.04% 0.66 20 39 SEQ ID NO: 9082 0.03% 0.6 HLA A 0201-9 mers Максимально возможная оценка с использованием этой молекулы типа 3925227.1 1 15 SEQ ID NO: 9083 0.00% 14.1442686 2 27 SEQ ID NO: 9084 0.00% 9.598176 3 22 SEQ ID NO: 9085 0.00% 9.5634 4 9 SEQ ID NO: 9086 0.00% 5.546246013 5 2 SEQ ID NO: 9087 0.00% 5.526462816 6 24 SEQ ID NO: 9088 0.00% 4.88163753 7 17 SEQ ID NO: 9089 0.00% 3.699285408 8 31 SEQ ID NO: 9090 0.00% 2.29699206 9 6 SEQ ID NO: 9091 0.00% 2.0016040674 10 7 SEQ ID NO: 9092 0.00% 0.91287 11 49 SEQ ID NO: 9093 0.00% 0.71805678 12 16 SEQ ID NO: 9094 0.00% 0.6694257042 13 12 SEQ ID NO: 9095 0.00% 0.6539828625 HLA A 0201-10 mers Максимально возможная оценка с использованием этой молекулы типа 3925227.1 1 16 SEQ ID NO: 9096 0.00% 34.28765802 2 19 SEQ ID NO: 9097 0.00% 18.9368775 3 14 SEQ ID NO: 9098 0.00% 14.1442686 4 27 SEQ ID NO: 9099 0.00% 11.406528 5 26 SEQ ID NO: 9100 0.00% 10.9304361558 6 34 SEQ ID NO: 9101 0.00% 5.580927 7 6 SEQ ID NO: 9102 0.00% 4.865742 8 9 SEQ ID NO: 9103 0.00% 2.64106953 9 50 SEQ ID NO: 9104 0.00% 2.6275752 10 30 SEQ ID NO: 9105 0.00% 2.29699206 11 7 SEQ ID NO: 9106 0.00% 0.86083641 12 42 SEQ ID NO: 9107 0.00% 0.7049592 13 22 SEQ ID NO: 9108 0.00% 0.6628440357 14 2 SEQ ID NO: 9109 0.00% 0.6530644656 HLA A 1101-9 mers Максимально возможная оценка с использованием этой молекулы тип 36 1 37 SEQ ID NO: 9110 15% 5.4 2 38 SEQ ID NO: 9111 2.22% 0.8 HLA A 1101-10 mers Максимально возможная оценка с использованием этой молекулы тип 36 1 37 SEQ ID NO: 9112 7.5% 2.7 HLA B7-9 mers Максимально возможная оценка с использованием этой молекулы типа 5400 1 35 SEQ ID NO: 9113 3.70% 200 2 17 SEQ ID NO: 9114 0.11% 6 3 6 SEQ ID NO: 9115 0.07% 4 4 20 SEQ ID NO: 9116 0.07% 4 5 31 SEQ ID NO: 9117 0.07% 4 6 43 SEQ ID NO: 9118 0.07% 4 7 7 SEQ ID NO: 9119 0.03% 2 8 23 SEQ ID NO: 9120 0.02% 1.2 9 24 SEQ ID NO: 9121 0.02% 1.2 10 10 SEQ ID NO: 9122 0.01% 0.9 HLA B7-10 mers Максимально возможная оценка с использованием этой молекулы типа 5400 1 35 SEQ ID NO: 9123 0.09% 5 2 19 SEQ ID NO: 9124 0.07% 4 3 30 SEQ ID NO: 9125 0.07% 4 4 34 SEQ ID NO: 9126 0.07% 4 5 7 SEQ ID NO: 9127 0.03% 2 6 16 SEQ ID NO: 9128 0.03% 1.8 7 23 SEQ ID NO: 9129 0.02% 1.2 8 50 SEQ ID NO: 9130 0.02% 1.2 9 9 SEQ ID NO: 9131 0.01% 1

[1682] ТАБЛИЦА-US-00086 Таблица 22 Эпитопы для SEQ ID нет: 6048 Начало % от макс. Ранг позиция последовательность оценка оценка HLA A1-9 mers Максимально возможная оценка с использованием этой молекулы типа 5625 1 66 SEQ ID NO: 9132 0.44% 25 2 80 SEQ ID NO: 9133 0.08% 5 3 93 SEQ ID NO: 9134 0.04% 2.7 4 11 SEQ ID NO: 9135 0.04% 2.5 5 89 SEQ ID NO: 9136 0.04% 2.25 6 48 SEQ ID NO: 9137 0.01% 1 7 3 SEQ ID NO: 9138 0.00% 0.5 8 9 SEQ ID NO: 9139 0.00% 0.5 9 56 SEQ ID NO: 9140 0.00% 0.5 10 101 SEQ ID NO: 9141 0.00% 0.5 11 106 SEQ ID NO: 9142 0.00% 0.5 12 110 SEQ ID NO: 9143 0.00% 0.5 HLA A1-10 mers Максимально возможная оценка с использованием этой молекулы типа 5625 1 30 SEQ ID NO: 9144 0.4% 22.5 2 88 SEQ ID NO: 9145 0.12% 6.75 3 48 SEQ ID NO: 9146 0.04% 2.5 4 55 SEQ ID NO: 9147 0.02% 1.25 5 13 SEQ ID NO: 9148 0.01% 0.9 6 79 SEQ ID NO: 9149 0.01% 0.75 7 93 SEQ ID NO: 9150 0.01% 0.675 8 2 SEQ ID NO: 9151 0.00% 0.5 9 8 SEQ ID NO: 9152 0.00% 0.5 10 65 SEQ ID NO: 9153 0.00% 0.5 11 66 SEQ ID NO: 9154 0.00% 0.5 12 80 SEQ ID NO: 9155 0.00% 0.5 13 105 SEQ ID NO: 9156 0.00% 0.5 14 109 SEQ ID NO: 9157 0.00% 0.5 HLA A3-9 mers Максимально возможная оценка с использованием этой молекулы типа 12150 1 109 SEQ ID NO: 9158 0.74% 90 2 3 SEQ ID NO: 9159 0.24% 30 3 111 SEQ ID NO: 9160 0.12% 15 4 106 SEQ ID NO: 9161 0.07% 9 5 95 SEQ ID NO: 9162 0.05% 6.075 6 101 SEQ ID NO: 9163 0.04% 6 7 110 SEQ ID NO: 9164 0.02% 3.6 8 84 SEQ ID NO: 9165 0.02% 3 9 80 SEQ ID NO: 9166 0.02% 2.7 10 37 SEQ ID NO: 9167 0.01% 2.25 11 9 SEQ ID NO: 9168 0.01% 2 12 54 SEQ ID NO: 9169 0.01% 2 13 99 SEQ ID NO: 9170 0.01% 1.35 14 1 SEQ ID NO: 9171 0.01% 1.215 15 11 SEQ ID NO: 9172 0.00% 0.9 16 15 SEQ ID NO: 9173 0.00% 0.9 17 69 SEQ ID NO: 9174 0.00% 0.6 18 5 SEQ ID NO: 9175 0.00% 0.54 19 103 SEQ ID NO: 9176 0.00% 0.54 HLA A3-10 mers Максимально возможная оценка с использованием этой молекулы типа 12150 1 75 SEQ ID NO: 9177 0.49% 60 2 109 SEQ ID NO: 9178 0.29% 36 3 22 SEQ ID NO: 9179 0.14% 18 4 15 SEQ ID NO: 9180 0.04% 6 5 110 SEQ ID NO: 9181 0.01% 2.25 6 95 SEQ ID NO: 9182 0.01% 1.8 7 101 SEQ ID NO: 9183 0.01% 1.35 8 43 SEQ ID NO: 9184 0.00% 1 9 2 SEQ ID NO: 9185 0.00% 0.9 10 5 SEQ ID NO: 9186 0.00% 0.9 11 7 SEQ ID NO: 9187 0.00% 0.9 12 107 SEQ ID NO: 9188 0.00% 0.9 13 102 SEQ ID NO: 9189 0.00% 0.81 14 3 SEQ ID NO: 9190 0.00% 0.75 15 8 SEQ ID NO: 9191 0.00% 0.6 16 103 SEQ ID NO: 9192 0.00% 0.54 HLA A24-9 mers Максимально возможная оценка с

использованием этой молекулы типа 1596.672 1 88 SEQ ID NO: 9193 1.66% 26.6112 2 77 SEQ ID NO: 9194 0.77% 12.32 3 18 SEQ ID NO: 9195 0.56% 9 4 108 SEQ ID NO: 9196 0.56% 9 5 92 SEQ ID NO: 9197 0.54% 8.64 6 96 SEQ ID NO: 9198 0.54% 8.64 7 73 SEQ ID NO: 9199 0.46% 7.5 8 40 SEQ ID NO: 9200 0.45% 7.2 9 104 SEQ ID NO: 9201 0.42% 6.72 10 8 SEQ ID NO: 9202 0.41% 6.6 11 21 SEQ ID NO: 9203 0.37% 6 12 102 SEQ ID NO: 9204 0.37% 6 13 22 SEQ ID NO: 9205 0.25% 4 14 68 SEQ ID NO: 9206 0.25% 4 15 106 SEQ ID NO: 9207 0.22% 3.6 16 1 SEQ ID NO: 9208 0.18% 3 17 79 SEQ ID NO: 9209 0.18% 3 18 93 SEQ ID NO: 9210 0.18% 3 19 101 SEQ ID NO: 9211 0.18% 3 20 37 SEQ ID NO: 9212 0.15% 2.4 HLA A24-10 mers Максимально возможная оценка с использованием этой молекулы типа 1596.672 1 100 SEQ ID NO: 9213 0.93% 15 2 18 SEQ ID NO: 9214 0.78% 12.6 3 98 SEQ ID NO: 9215 0.52% 8.4 4 73 SEQ ID NO: 9216 0.46% 7.5 5 91 SEQ ID NO: 9217 0.45% 7.2 6 103 SEQ ID NO: 9218 0.42% 6.72 7 7 SEQ ID NO: 9219 0.41% 6.6 8 21 SEQ ID NO: 9220 0.37% 6 9 46 SEQ ID NO: 9221 0.37% 6 10 93 SEQ ID NO: 9222 0.37% 6 11 96 SEQ ID NO: 9223 0.37% 6 12 101 SEQ ID NO: 9224 0.37% 6 13 77 SEQ ID NO: 9225 0.25% 4 14 92 SEQ ID NO: 9226 0.22% 3.6 15 105 SEQ ID NO: 9227 0.22% 3.6 16 2 SEQ ID NO: 9228 0.18% 3 17 53 SEQ ID NO: 9229 0.18% 3 18 36 SEQ ID NO: 9230 0.12% 2 19 55 SEQ ID NO: 9231 0.12% 2 20 102 SEQ ID NO: 9232 0.11% 1.8 HLA A 0201-9 mers Максимально возможная оценка с использованием этой молекулы типа 3925227.1 1 84 SEQ ID NO: 9233 0.01% 441.342216 2 102 SEQ ID NO: 9234 0.00% 63.16728165 3 107 SEQ ID NO: 9235 0.00% 51.882640425 4 1 SEQ ID NO: 9236 0.00% 43.8816609 5 95 SEQ ID NO: 9237 0.00% 33.40165248 6 2 SEQ ID NO: 9238 0.00% 24.66305226 7 92 SEQ ID NO: 9239 0.00% 22.64458905 8 103 SEQ ID NO: 9240 0.00% 20.70206586 9 47 SEQ ID NO: 9241 0.00% 11.175953184 10 94 SEQ ID NO: 9242 0.00% 8.452983 11 15 SEQ ID NO: 9243 0.00% 8.1793152 12 8 SEQ ID NO: 9244 0.00% 4.993461 13 5 SEQ ID NO: 9245 0.00% 4.57284528 14 99 SEQ ID NO: 9246 0.00% 3.999468528 15 105 SEQ ID NO: 9247 0.00% 2.231322 16 20 SEQ ID NO: 9248 0.00% 1.3524 17 62 SEQ ID NO: 9249 0.00% 0.8631693 18 6 SEQ ID NO: 9250 0.00% 0.824619 19 57 SEQ ID NO: 9251 0.00% 0.72105 20 58 SEQ ID NO: 9252 0.00% 0.7147572 HLA A 0201-10 mers Максимально возможная оценка с использованием этой молекулы типа 3925227.1 1 101 SEQ ID NO: 9253 0.03% 1243.078056 2 3 SEQ ID NO: 9254 0.01% 592.944462 3 106 SEQ ID NO: 9255 0.00% 94.2678 4 5 SEQ ID NO: 9256 0.00% 43.42032 5 107 SEQ ID NO: 9257 0.00% 33.30332334 6 102 SEQ ID NO: 9258 0.00% 32.53181778 7 54 SEQ ID NO: 9259 0.00% 27.324 8 7 SEQ ID NO: 9260 0.00% 21.3624 9 1 SEQ ID NO: 9261 0.00% 13.723479 10 95 SEQ ID NO: 9262 0.00% 13.00344192 11 94 SEQ ID NO: 9263 0.00% 10.01276388 12 99 SEQ ID NO: 9264 0.00% 5.6615328 13 39 SEQ ID NO: 9265 0.00% 3.6304212 14 111 SEQ ID NO: 9266 0.00% 2.53368 15 103 SEQ ID NO: 9267 0.00% 2.475394803 16 14 SEQ ID NO: 9268 0.00% 2.4519012 17 19 SEQ ID NO: 9269 0.00% 2.07604992 18 29 SEQ ID NO: 9270 0.00% 1.8179154 19 57 SEQ ID NO: 9271 0.00% 1.52076 20 47 SEQ ID NO: 9272 0.00% 1.27712376 HLA A 1101-9 mers Максимально возможная оценка с использованием этой молекулы тип 36 1 80 SEQ ID NO: 9273 3.33% 1.2 2 69 SEQ ID NO: 9274 1.66% 0.6 3 109 SEQ ID NO: 9275 1.66% 0.6 HLA A 1101-10 mers Максимально возможная оценка с использованием этой молекулы тип 36 1 22 SEQ ID NO: 9276 11.11% 4 HLA B7-9 mers Максимально возможная оценка с использованием этой молекулы типа 5400 1 22 SEQ ID NO: 9277 3.70% 200 2 77 SEQ ID NO: 9278 2.22% 120 3 104 SEQ ID NO: 9279 0.22% 12 4 40 SEQ ID NO: 9280 0.11% 6 5 8 SEQ ID NO: 9281 0.07% 4 6 21 SEQ ID NO: 9282 0.07% 4 7 68 SEQ ID NO: 9283 0.07% 4 8 92 SEQ ID NO: 9284 0.07% 4 9 102 SEQ ID NO: 9285 0.07% 4 10 46 SEQ ID NO: 9286 0.03% 2 11 98 SEQ ID NO: 9287 0.03% 2 12 103 SEQ ID NO: 9288 0.03% 2 13 88 SEQ ID NO: 9289 0.02% 1.2 14 105 SEQ ID NO: 9290 0.01% 0.9 15 43 SEQ ID NO: 9291 0.01% 0.6 16 79 SEQ ID NO: 9292 0.01% 0.6 17 95 SEQ ID NO: 9293 0.01% 0.6 18 107 SEQ ID NO: 9294 0.00% 0.5 HLA B7-10 mers Максимально возможная оценка с использованием этой молекулы типа 5400 1 46 SEQ ID NO: 9295 1.48% 80 2 98 SEQ ID NO: 9296 1.48% 80 3 91 SEQ ID NO: 9297 0.37% 20 4 103 SEQ ID NO: 9298 0.37% 20 5 7 SEQ ID NO: 9299 0.07% 4 6 21 SEQ ID NO: 9300 0.07% 4 7 101 SEQ ID NO: 9301 0.07% 4 8 107 SEQ ID NO: 9302 0.03% 2 9 67 SEQ ID NO: 9303 0.02% 1.2 10 93 SEQ ID NO: 9304 0.02% 1.2 11 69 SEQ ID NO: 9305 0.01% 1 12 39 SEQ ID NO: 9306 0.01% 0.6 13 77 SEQ ID NO: 9307 0.01% 0.6 14 22 SEQ ID NO: 9308 0.00% 0.5

[1683] ТАБЛИЦА-США-00087 Таблица 23 Эпитопы для SEQ ID нет: 6049 Начало % от макс. Ранг позиция последовательность оценка оценка HLA A1-9 mers Максимально возможная оценка с использованием этой молекулы типа 5625 1 0 SEQ ID NO: 9309 0.2% 11.25 2 35 SEQ ID NO: 9310 0.01% 0.9 3 4 SEQ ID NO: 9311 0.00% 0.5 4 5 SEQ ID NO: 9312 0.00% 0.5 5 10 SEQ ID NO: 9313 0.00% 0.5 6 19 SEQ ID NO: 9314 0.00% 0.5 7 21 SEQ ID NO: 9315 0.00% 0.5 HLA A1-10 mers Максимально возможная оценка с использованием этой молекулы типа 5625 1 0 SEQ ID NO: 9316 0.2% 11.25 2 5 SEQ ID NO: 9317 0.04% 2.5 3 33 SEQ ID NO: 9318 0.02% 1.5 4 3 SEQ ID NO: 9319 0.02% 1.25 5 9 SEQ ID NO: 9320 0.00% 0.5 6 18 SEQ ID NO: 9321 0.00% 0.5 7 20 SEQ ID NO: 9322 0.00% 0.5 HLA A3-9 mers Максимально возможная оценка с использованием этой молекулы типа 12150 1 4 SEQ ID NO: 9323 0.14% 18 2 16 SEQ ID NO: 9324 0.11% 13.5 3 23 SEQ ID NO: 9325 0.06% 8.1 4 18 SEQ ID NO: 9326 0.03% 4.05 5 21 SEQ ID NO: 9327 0.01% 2.025 6 9 SEQ ID NO: 9328 0.01% 1.8 7 15 SEQ ID NO: 9329 0.01% 1.8 8 25 SEQ ID NO: 9330 0.01% 1.8 9 12 SEQ ID NO: 9331 0.00% 0.9 10 19 SEQ ID NO: 9332 0.00% 0.9 11 20 SEQ ID NO: 9333 0.00% 0.9 12 2 SEQ ID NO: 9334 0.00% 0.81 13 22 SEQ ID NO: 9335 0.00% 0.81 14 10 SEQ ID NO: 9336 0.00% 0.6 HLA A3-10 mers Максимально возможная оценка с использованием этой молекулы типа 12150 1 20 SEQ ID NO: 9337 0.16% 20.25 2 9 SEQ ID NO: 9338 0.09% 12 3 16 SEQ ID NO: 9339 0.07% 9 4 18 SEQ ID NO: 9340 0.07% 9 5 22 SEQ ID NO: 9341 0.06% 8.1 6 4 SEQ ID NO: 9342 0.03% 4.05 7 15 SEQ ID NO: 9343 0.03% 4.05 8 12 SEQ ID NO: 9344 0.02% 3.6 9 3 SEQ ID NO: 9345 0.00% 0.9 10 33 SEQ ID NO: 9346 0.00% 0.6 11 2 SEQ ID NO: 9347 0.00% 0.54 12 24 SEQ ID NO: 9348 0.00% 0.54 HLA A24-9 mers Максимально возможная оценка с использованием этой молекулы типа 1596.672 1 8 SEQ ID NO: 9349 18.78% 300 2 11 SEQ ID NO: 9350 1.87% 30 3 28 SEQ ID NO: 9351 1.50% 24 4 7 SEQ ID NO: 9352 0.75% 12 5 17 SEQ ID NO: 9353 0.56% 9 6 14 SEQ ID NO: 9354 0.46% 7.5 7 23 SEQ ID NO: 9355 0.37% 6 8 13 SEQ ID NO: 9356 0.36% 5.76 9 2 SEQ ID NO: 9357 0.35% 5.6 10 16 SEQ ID NO: 9358 0.35% 5.6 11 9 SEQ ID NO: 9359 0.30% 4.8 12 21 SEQ ID NO: 9360 0.26% 4.2 13 5 SEQ ID NO: 9361 0.25% 4 14 4 SEQ ID NO: 9362 0.22% 3.6 15 0 SEQ ID NO: 9363 0.18% 3 16 19 SEQ ID NO: 9364 0.18% 3 17 10 SEQ ID NO: 9365 0.15% 2.4 18 18 SEQ ID NO: 9366 0.13% 2.1 19 25 SEQ ID NO: 9367 0.06% 1.1 20 15 SEQ ID NO: 9368 0.05% 0.9 HLA A24-10 mers Максимально возможная оценка с использованием этой молекулы типа 1596.672 1 8 SEQ ID NO: 9369 22.54% 360 2 7 SEQ ID NO: 9370 1.25% 20 3 17 SEQ ID NO: 9371 0.65% 10.5 4 15 SEQ ID NO: 9372 0.52% 8.4 5 4 SEQ ID NO: 9373 0.45% 7.2 6 22 SEQ ID NO: 9374 0.37% 6 7 12 SEQ ID NO: 9375 0.36% 5.76 8 27 SEQ ID NO: 9376 0.30% 4.8 9 14 SEQ ID NO: 9377 0.28% 4.5 10 20 SEQ ID NO: 9378 0.26% 4.2 11 10 SEQ ID NO: 9379 0.25% 4 12 3 SEQ ID NO: 9380 0.18% 3 13 18 SEQ ID NO: 9381 0.18% 3 14 9 SEQ ID NO: 9382 0.15% 2.4 15 24 SEQ ID NO: 9383 0.10% 1.65 16 16 SEQ ID NO: 9384 0.07% 1.2 17 13 SEQ ID NO: 9385 0.06% 1 18 11 SEQ ID NO: 9386 0.05% 0.9 19 1 SEQ ID NO: 9387 0.05% 0.84 HLA A 0201-9 mers Максимально возможная оценка с использованием этой молекулы типа 3925227.1 1 12 SEQ ID NO: 9388 0.10% 4267.988928 2 23 SEQ ID NO: 9389 0.03% 1360.69088544 3 9 SEQ ID NO: 9390 0.01% 569.948832 4 16 SEQ ID NO: 9391 0.00% 309.0498408 5 15 SEQ ID NO: 9392 0.00% 79.73570448 6 2 SEQ ID NO: 9393 0.00% 51.109542 7 18 SEQ ID NO: 9394 0.00% 45.25539984 8 25 SEQ ID NO: 9395 0.00% 34.28765802 9 22 SEQ ID NO: 9396 0.00% 26.532116325 10 5 SEQ ID NO: 9397 0.00% 25.26691266 11 21 SEQ ID NO: 9398 0.00% 4.72873208445 12 11 SEQ ID NO: 9399 0.00% 2.638538265 13 8 SEQ ID NO: 9400 0.00% 2.4274552038 14 4 SEQ ID NO: 9401 0.00% 1.7415324 15 20 SEQ ID NO: 9402 0.00% 1.6025526 16 13 SEQ ID NO: 9403 0.00% 1.453803297 17 35 SEQ ID NO: 9404 0.00% 1.36878336 18 3 SEQ ID NO: 9405 0.00% 0.824619 19 33 SEQ ID NO: 9406 0.00% 0.513774 HLA A 0201-10 mers Максимально возможная оценка с использованием этой молекулы типа 3925227.1 1 22 SEQ ID NO: 9407 0.09% 3636.068421648 2 4 SEQ ID NO: 9408 0.02% 1107.960876 3 15 SEQ ID NO: 9409 0.02% 836.2525104 4 16 SEQ ID NO: 9410 0.00% 150.9313176 5 12 SEQ ID NO: 9411 0.00% 76.55002416 6 1 SEQ ID NO: 9412 0.00% 49.0273014 7 10 SEQ ID NO: 9413 0.00% 42.1638414747 8 20 SEQ ID NO: 9414 0.00% 9.29480508 9 24 SEQ ID NO: 9415 0.00% 9.2669346 10 13 SEQ ID NO: 9416 0.00% 7.96581954 11 21 SEQ ID NO: 9417 0.00% 5.051306761875 12 5 SEQ ID NO: 9418 0.00% 2.6941464 13 11 SEQ ID NO: 9419 0.00% 2.3839914 14 34 SEQ ID NO: 9420 0.00% 1.465422 15 2 SEQ ID NO: 9421 0.00% 0.70794 16 9 SEQ ID NO: 9422 0.00% 0.6513048 17 19 SEQ ID NO: 9423 0.00% 0.51882640425 HLA A 1101-10 mers Максимально возможная оценка с использованием этой молекулы тип 36 1 33 SEQ ID NO: 9424 1.66% 0.6 HLA B7-9 mers Максимально возможная оценка с использованием этой молекулы типа 5400 1 13 SEQ ID NO: 9425 0.22% 12 2 2 SEQ ID NO: 9426 0.07% 4 3 9 SEQ ID NO: 9427 0.07% 4 4 16 SEQ ID NO: 9428 0.07% 4 5 23 SEQ ID NO: 9429 0.07% 4 6 5 SEQ ID NO: 9430 0.02% 1.2 7 15 SEQ ID NO: 9431 0.01% 1 HLA B7-10 mers Максимально возможная оценка с использованием этой молекулы типа 5400 1 4 SEQ ID NO: 9432 0.07% 4 2 10 SEQ ID NO: 9433 0.07% 4 3 12 SEQ ID NO: 9434 0.07% 4 4 15 SEQ ID NO: 9435 0.07% 4 5 22 SEQ ID NO: 9436 0.07% 4 6 13 SEQ ID NO: 9437 0.02% 1.2

[1684] ТАБЛИЦА-US-00088 Таблица 24 Эпитопы для SEQ ID нет: 6050 Начало % от макс. Ранг позиция последовательность оценка оценка HLA A1-9 mers Максимально возможная оценка с использованием этой молекулы типа 5625 1 47 SEQ ID NO: 9438 0.01% 0.75 2 21 SEQ ID NO: 9439 0.00% 0.5 3 53 SEQ ID NO: 9440 0.00% 0.5 HLA A1-10 mers Максимально возможная оценка с использованием этой молекулы типа 5625 1 16 SEQ ID NO: 9441 0.04% 2.5 2 71 SEQ ID NO: 9442 0.04% 2.5 3 47 SEQ ID NO: 9443 0.02% 1.5 4 62 SEQ ID NO: 9444 0.01% 0.9 5 20 SEQ ID NO: 9445 0.00% 0.5 6 38 SEQ ID NO: 9446 0.00% 0.5 HLA A3-9 mers Максимально возможная оценка с использованием этой молекулы типа 12150 1 54 SEQ ID NO: 9447 0.02% 2.7 2 17 SEQ ID NO: 9448 0.01% 2 3 3 SEQ ID NO: 9449 0.01% 1.8 HLA A3-10 mers Максимально возможная оценка с использованием этой молекулы типа 12150 1 22 SEQ ID NO: 9450 0.09% 12 2 16 SEQ ID NO: 9451 0.01% 2 3 54 SEQ ID NO: 9452 0.00% 0.9 HLA A24-9 mers Максимально возможная оценка с использованием этой молекулы типа 1596.672 1 70 SEQ ID NO: 9453 2.10% 33.6 2 7 SEQ ID NO: 9454 1.12% 18 3 60 SEQ ID NO: 9455 0.46% 7.5 4 54 SEQ ID NO: 9456 0.37% 6 5 14 SEQ ID NO: 9457 0.31% 5 6 19 SEQ ID NO: 9458 0.30% 4.8 7 47 SEQ ID NO: 9459 0.30% 4.8 8 12 SEQ ID NO: 9460 0.25% 4 9 15 SEQ ID NO: 9461 0.25% 4 10 67 SEQ ID NO: 9462 0.25% 4 11 21 SEQ ID NO: 9463 0.18% 3 12 37 SEQ ID NO: 9464 0.06% 1 13 27 SEQ ID NO: 9465 0.03% 0.5 HLA A24-10 mers Максимально возможная оценка с использованием этой молекулы типа 1596.672 1 14 SEQ ID NO: 9466 12.52% 200 2 7 SEQ ID NO: 9467 0.93% 15 3 11 SEQ ID NO: 9468 0.75% 12 4 60 SEQ ID NO: 9469 0.56% 9 5 18 SEQ ID NO: 9470 0.45% 7.2 6 46 SEQ ID NO: 9471 0.45% 7.2 7 53 SEQ ID NO: 9472 0.37% 6 8 69 SEQ ID NO: 9473 0.35% 5.6 9 66 SEQ ID NO: 9474 0.25% 4 10 20 SEQ ID NO: 9475 0.12% 2 11 47 SEQ ID NO: 9476 0.07% 1.2 12 36 SEQ ID NO: 9477 0.06% 1 13 26 SEQ ID NO: 9478 0.04% 0.75 14 70 SEQ ID NO: 9479 0.04% 0.72 HLA A 0201-9 mers Максимально возможная оценка с

использованием этой молекулы типа 3925227.1 1 54 SEQ ID NO: 9480 0.02% 881.199 2 26 SEQ ID NO: 9481 0.00% 95.013 3 61 SEQ ID NO: 9482 0.00% 93.69648 4 19 SEQ ID NO: 9483 0.00% 40.2894864 5 74 SEQ ID NO: 9484 0.00% 12.6684 6 35 SEQ ID NO: 9485 0.00% 10.34586 7 69 SEQ ID NO: 9486 0.00% 3.3704706 8 13 SEQ ID NO: 9487 0.00% 1.656 9 15 SEQ ID NO: 9488 0.00% 1.47537042 10 68 SEQ ID NO: 9489 0.00% 0.966 11 22 SEQ ID NO: 9490 0.00% 0.942678 12 12 SEQ ID NO: 9491 0.00% 0.7669695 13 36 SEQ ID NO: 9492 0.00% 0.52661835 HLA A 0201-10 mers Максимально возможная оценка с использованием этой молекулы типа 3925227.1 1 61 SEQ ID NO: 9493 0.00% 93.69648 2 25 SEQ ID NO: 9494 0.00% 63.33035625 3 34 SEQ ID NO: 9495 0.00% 50.232 4 53 SEQ ID NO: 9496 0.00% 45.2838375 5 26 SEQ ID NO: 9497 0.00% 14.35752 6 27 SEQ ID NO: 9498 0.00% 2.8557858 7 17 SEQ ID NO: 9499 0.00% 2.3973222 8 36 SEQ ID NO: 9500 0.00% 1.798209 9 69 SEQ ID NO: 9501 0.00% 1.03521597 10 67 SEQ ID NO: 9502 0.00% 0.966 11 68 SEQ ID NO: 9503 0.00% 0.910938 12 11 SEQ ID NO: 9504 0.00% 0.7669695 HLA A 1101-9 mers Максимально возможная оценка с использованием этой молекулы типа 36 1 17 SEQ ID NO: 9505 2.22% 0.8 HLA A 1101-10 mers Максимально возможная оценка с использованием этой молекулы типа 36 1 16 SEQ ID NO: 9506 5.55% 2 HLA B7-9 mers Максимально возможная оценка с использованием этой молекулы типа 5400 1 27 SEQ ID NO: 9507 0.37% 20 2 54 SEQ ID NO: 9508 0.22% 12 3 70 SEQ ID NO: 9509 0.22% 12 4 67 SEQ ID NO: 9510 0.11% 6 5 12 SEQ ID NO: 9511 0.07% 4 6 15 SEQ ID NO: 9512 0.07% 4 7 19 SEQ ID NO: 9513 0.07% 4 8 49 SEQ ID NO: 9514 0.03% 2 9 69 SEQ ID NO: 9515 0.03% 1.8 10 47 SEQ ID NO: 9516 0.02% 1.2 11 5 SEQ ID NO: 9517 0.01% 1 12 9 SEQ ID NO: 9518 0.01% 1 13 35 SEQ ID NO: 9519 0.01% 1 14 37 SEQ ID NO: 9520 0.01% 0.6 15 68 SEQ ID NO: 9521 0.01% 0.6 HLA B7-10 mers Максимально возможная оценка с использованием этой молекулы типа 5400 1 69 SEQ ID NO: 9522 0.66% 36 2 53 SEQ ID NO: 9523 0.22% 12 3 5 SEQ ID NO: 9524 0.13% 7 5 4 66 SEQ ID NO: 9525 0.11% 6 5 11 SEQ ID NO: 9526 0.07% 4 6 27 SEQ ID NO: 9527 0.07% 4 7 46 SEQ ID NO: 9528 0.07% 4 8 18 SEQ ID NO: 9529 0.02% 1 2 9 9 SEQ ID NO: 9530 0.01% 1 10 26 SEQ ID NO: 9531 0.01% 1 11 25 SEQ ID NO: 9532 0.01% 0.75 12 17 SEQ ID NO: 9533 0.01% 0.6 13 36 SEQ ID NO: 9534 0.01% 0.6 14 68 SEQ ID NO: 9535 0.01% 0.6 15 35 SEQ ID NO: 9536 0.00% 0.5 16 42 SEQ ID NO: 9537 0.00% 0.5 17 73 SEQ ID NO: 9538 0.00% 0.5

[1685] ТАБЛИЦА-США-00089 Таблица 25 Эпитопы для SEQ ID нет: 6052 Начало % от макс. Ранг позиция последовательность оценка оценка HLA A1-9 mers Максимально возможная оценка с использованием этой молекулы типа 5625 1 365 SEQ ID NO: 9539 0.8% 45 2 397 SEQ ID NO: 9540 0.44% 25 3 229 SEQ ID NO: 9541 0.32% 18 4 103 SEQ ID NO: 9542 0.17% 10 5 338 SEQ ID NO: 9543 0.17% 10 6 251 SEQ ID NO: 9544 0.16% 9 7 79 SEQ ID NO: 9545 0.11% 6 25 8 119 SEQ ID NO: 9546 0.10% 6 9 361 SEQ ID NO: 9547 0.08% 5 10 60 SEQ ID NO: 9548 0.04% 2 25 11 101 SEQ ID NO: 9549 0.04% 2 25 12 278 SEQ ID NO: 9550 0.04% 2 25 13 23 SEQ ID NO: 9551 0.02% 1 25 14 164 SEQ ID NO: 9552 0.02% 1 25 15 165 SEQ ID NO: 9553 0.02% 1 25 16 295 SEQ ID NO: 9554 0.02% 1 25 17 172 SEQ ID NO: 9555 0.01% 0.9 18 0 SEQ ID NO: 9556 0.01% 0.75 19 311 SEQ ID NO: 9557 0.01% 0.75 20 78 SEQ ID NO: 9558 0.01% 0.625 HLA A1-10 mers Максимально возможная оценка с использованием этой молекулы типа 5625 1 114 SEQ ID NO: 9559 1.11% 62.5 2 134 SEQ ID NO: 9560 0.8% 45 3 365 SEQ ID NO: 9561 0.8% 45 4 77 SEQ ID NO: 9562 0.66% 37.5 5 103 SEQ ID NO: 9563 0.44% 25 6 23 SEQ ID NO: 9564 0.22% 12.5 7 338 SEQ ID NO: 9565 0.17% 10 8 361 SEQ ID NO: 9566 0.17% 10 9 324 SEQ ID NO: 9567 0.11% 6 25 10 375 SEQ ID NO: 9568 0.11% 6 25 11 79 SEQ ID NO: 9569 0.04% 2 5 12 295 SEQ ID NO: 9570 0.04% 2 5 13 346 SEQ ID NO: 9571 0.04% 2 5 14 378 SEQ ID NO: 9572 0.03% 2 15 251 SEQ ID NO: 9573 0.03% 1 8 16 214 SEQ ID NO: 9574 0.02% 1 125 17 160 SEQ ID NO: 9575 0.01% 1 18 172 SEQ ID NO: 9576 0.01% 0.9 19 229 SEQ ID NO: 9577 0.01% 0.9 20 376 SEQ ID NO: 9578 0.01% 0.9 HLA A3-9 mers Максимально возможная оценка с использованием этой молекулы типа 12150 1 229 SEQ ID NO: 9579 0.49% 60 2 361 SEQ ID NO: 9580 0.27% 33.75 3 330 SEQ ID NO: 9581 0.16% 20 4 218 SEQ ID NO: 9582 0.09% 12 5 338 SEQ ID NO: 9583 0.04% 6 6 352 SEQ ID NO: 9584 0.04% 6 7 103 SEQ ID NO: 9585 0.04% 5 4 8 291 SEQ ID NO: 9586 0.01% 2 9 241 SEQ ID NO: 9587 0.01% 1 8 10 290 SEQ ID NO: 9588 0.01% 1 8 11 316 SEQ ID NO: 9589 0.01% 1 8 12 222 SEQ ID NO: 9590 0.01% 1 35 13 266 SEQ ID NO: 9591 0.01% 1 35 14 53 SEQ ID NO: 9592 0.00% 1 15 100 SEQ ID NO: 9593 0.00% 0.9 16 138 SEQ ID NO: 9594 0.00% 0.9 17 240 SEQ ID NO: 9595 0.00% 0.9 18 119 SEQ ID NO: 9596 0.00% 0.675 19 44 SEQ ID NO: 9597 0.00% 0.6 20 161 SEQ ID NO: 9598 0.00% 0.6 HLA A3-10 mers Максимально возможная оценка с использованием этой молекулы типа 12150 1 338 SEQ ID NO: 9599 0.49% 60 2 160 SEQ ID NO: 9600 0.32% 40 3 352 SEQ ID NO: 9601 0.24% 30 4 361 SEQ ID NO: 9602 0.18% 22.5 5 103 SEQ ID NO: 9603 0.13% 16.2 6 290 SEQ ID NO: 9604 0.07% 9 7 351 SEQ ID NO: 9605 0.07% 9 8 44 SEQ ID NO: 9606 0.04% 6 9 228 SEQ ID NO: 9607 0.03% 4 05 10 394 SEQ ID NO: 9608 0.02% 3 11 240 SEQ ID NO: 9609 0.02% 2 7 12 100 SEQ ID NO: 9610 0.01% 1 8 13 114 SEQ ID NO: 9611 0.01% 1 8 14 93 SEQ ID NO: 9612 0.01% 1 5 15 134 SEQ ID NO: 9613 0.01% 1 5 16 221 SEQ ID NO: 9614 0.01% 1 35 17 330 SEQ ID NO: 9615 0.00% 1 2 18 112 SEQ ID NO: 9616 0.00% 0.9 19 218 SEQ ID NO: 9617 0.00% 0.9 20 55 SEQ ID NO: 9618 0.00% 0.6 HLA A24-9 mers Максимально возможная оценка с использованием этой молекулы типа 1596.672 1 345 SEQ ID NO: 9619 1.50% 24 2 306 SEQ ID NO: 9620 0.75% 12 3 222 SEQ ID NO: 9621 0.54% 8.64 4 111 SEQ ID NO: 9622 0.51% 8.25 5 159 SEQ ID NO: 9623 0.45% 7 2 6 219 SEQ ID NO: 9624 0.45% 7 2 7 283 SEQ ID NO: 9625 0.45% 7 2 8 266 SEQ ID NO: 9626 0.42% 6 7 2 9 56 SEQ ID NO: 9627 0.41% 6 6 10 131 SEQ ID NO: 9628 0.37% 6 11 214 SEQ ID NO: 9629 0.37% 6 12 297 SEQ ID NO: 9630 0.37% 6 13 86 SEQ ID NO: 9631 0.31% 5 14 122 SEQ ID NO: 9632 0.31% 5 15 48 SEQ ID NO: 9633 0.30% 4 8 16 105 SEQ ID NO: 9634 0.30% 4 8 17 213 SEQ ID NO: 9635 0.30% 4 8 18 323 SEQ ID NO: 9636 0.30% 4 8 19 338 SEQ ID NO: 9637 0.30% 4 8 20 399 SEQ ID NO: 9638 0.30% 4 8 HLA A24-10 mers Максимально возможная оценка с использованием этой молекулы типа 1596.672 1 65 SEQ ID NO: 9639 0.93% 15 2 306 SEQ ID NO: 9640 0.75% 12 3 95 SEQ ID NO: 9641 0.66% 10.56 4 36 SEQ ID NO: 9642 0.60% 9 6 5 385 SEQ ID NO: 9643 0.50% 8 6 111 SEQ ID NO: 9644 0.46% 7 5 7 104 SEQ ID NO: 9645 0.45% 7 2 8 214 SEQ ID NO: 9646 0.45% 7 2 9 221 SEQ ID NO: 9647 0.45% 7 2 10 277 SEQ ID NO: 9648 0.45% 7 2 11 150 SEQ ID NO: 9649 0.37% 6 12 152 SEQ ID NO: 9650 0.37% 6 13 158 SEQ ID NO: 9651 0.37% 6 14 171 SEQ ID NO: 9652 0.37% 6 15 343 SEQ ID NO: 9653 0.37% 6 16 110 SEQ ID NO: 9654 0.34% 5 5 17 85 SEQ ID NO: 9655 0.31% 5 18 47 SEQ ID NO: 9656 0.30% 4 8 19 213 SEQ ID NO: 9657 0.30% 4 8 20 218 SEQ ID NO: 9658 0.30% 4 8 HLA A 0201-9 mers Максимально возможная оценка с использованием этой молекулы типа 3925227.1 1 222 SEQ ID NO: 9659 0.03% 1267.10434728 2 226 SEQ ID NO: 9660 0.00% 69.552 3 316 SEQ ID NO: 9661 0.00% 50.232 4 351 SEQ ID NO: 9662 0.00% 31.24872 5 159 SEQ ID NO: 9663 0.00% 13.6235739 6 406 SEQ ID NO: 9664 0.00% 11.4264 7 165 SEQ ID NO: 9665 0.00% 8.14407 8 238 SEQ ID NO: 9666 0.00% 7.0518 9 138 SEQ ID NO: 9667 0.00% 5.112072 10 130 SEQ ID NO: 9668 0.00% 3.00547233 11 303 SEQ ID NO: 9669 0.00% 2.59578 12 157 SEQ ID NO: 9670 0.00% 2.412585 13 219 SEQ ID NO: 9671 0.00% 2.103255861 14 305 SEQ ID NO: 9672 0.00% 1.86369 15 158 SEQ ID NO: 9673 0.00% 1.646892 16 331 SEQ ID NO: 9674 0.00% 1.614048 17 399 SEQ ID NO: 9675 0.00% 1.442246832 18 324 SEQ ID NO: 9676 0.00% 1.319625 19 312 SEQ ID NO: 9677 0.00% 1.233099 20 262 SEQ ID NO: 9678 0.00% 0.966 HLA A 0201-10 mers Максимально возможная оценка с использованием этой молекулы типа 3925227.1 1 221 SEQ ID NO: 9679 0.00% 309.0498408 2 112 SEQ ID NO: 9680 0.00% 98.26704 3 330 SEQ ID NO: 9681 0.00% 98.26704 4 158 SEQ ID NO: 9682 0.00% 36.31608 5 218 SEQ ID NO: 9683 0.00% 24.0754248 6 124 SEQ ID NO: 9684 0.00% 12.2199 7 55 SEQ ID NO: 9685 0.00% 10.467576 8 315 SEQ ID NO: 9686 0.00% 7.7274204 9 350 SEQ ID NO: 9687 0.00% 4.296699 10 405 SEQ ID NO: 9688 0.00% 4.286487 11 388 SEQ ID NO: 9689 0.00% 4.054785 12 322 SEQ ID NO: 9690 0.00% 3.883803 13 130 SEQ ID NO: 9691 0.00% 3.428691903 14 45 SEQ ID NO: 9692 0.00% 3.411230625 15 132 SEQ ID NO: 9693 0.00% 2.99943 16 410 SEQ ID NO: 9694 0.00% 2.63718 17 316 SEQ ID NO: 9695 0.00% 2.48686074 18 104 SEQ ID NO: 9696 0.00% 2.477311485 19 164 SEQ ID NO: 9697 0.00% 2.2011 20 282 SEQ ID NO: 9698 0.00% 2.16591 HLA A 1101-9 mers Максимально возможная оценка с использованием этой молекулы типа 36 1 361 SEQ ID NO: 9699 16.66% 6 2 53 SEQ ID NO: 9700 2.77% 1 3 240 SEQ ID NO: 9701 1.66% 0.6 4 241 SEQ ID NO: 9702 1.66% 0.6 HLA A 1101-10 mers Максимально возможная оценка с использованием этой молекулы типа 36 1 361 SEQ ID NO: 9703 16.66% 6 2 93 SEQ ID NO: 9704 8.33% 3 3 338 SEQ ID NO: 9705 3.33% 1 2 4 134 SEQ ID NO: 9706 2.77% 1 5 228 SEQ ID NO: 9707 2.5% 0.9 6 160 SEQ ID NO: 9708 2.22% 0.8 7 239 SEQ ID NO: 9709 1.66% 0.6 8 240 SEQ ID NO: 9710 1.66% 0.6 9 257 SEQ ID NO: 9711 1.66% 0.6 10 379 SEQ ID NO: 9712 1.66% 0.6 HLA B7-9 mers Максимально возможная оценка с использованием этой молекулы типа 5400 1 105 SEQ ID NO: 9713 14.81% 800 2 66 SEQ ID NO: 9714 1.48% 80 3 93 SEQ ID NO: 9715 0.92% 50 4 257 SEQ ID NO: 9716 0.55% 30 5 323 SEQ ID NO: 9717 0.37% 20 6 211 SEQ ID NO: 9718 0.22% 12 7 219 SEQ ID NO: 9719 0.22% 12 8 403 SEQ ID NO: 9720 0.18% 10 9 343 SEQ ID NO: 9721 0.14% 8 10 12 SEQ ID NO: 9722 0.11% 6 11 113 SEQ ID NO: 9723 0.11% 6 12 48 SEQ ID NO: 9724 0.07% 4 13 56 SEQ ID NO: 9725 0.07% 4 14 150 SEQ ID NO: 9726 0.07% 4 15 153 SEQ ID NO: 9727 0.07% 4 16 159 SEQ ID NO: 9728 0.07% 4 17 213 SEQ ID NO: 9729 0.07% 4 18 216 SEQ ID NO: 9730 0.07% 4 19 222 SEQ ID NO: 9731 0.07% 4 20 283 SEQ ID NO: 9732 0.07% 4 HLA B7-10 mers Максимально возможная оценка с использованием этой молекулы типа 5400 1 36 SEQ ID NO: 9733 1.48% 80 2 150 SEQ ID NO: 9734 1.48% 80 3 343 SEQ ID NO: 9735 1.48% 80 4 12 SEQ ID NO: 9736 1.11% 60 5 308 SEQ ID NO: 9737 1.11% 60 6 130 SEQ ID NO: 9738 0.37% 20 7 55 SEQ ID NO: 9739 0.22% 12 8 210 SEQ ID NO: 9740 0.22% 12 9 218 SEQ ID NO: 9741 0.22% 12 10 201 SEQ ID NO: 9742 0.18% 10 11 121 SEQ ID NO: 9743 0.14% 8 12 391 SEQ ID NO: 9744 0.13% 7 5 13 112 SEQ ID NO: 9745 0.11% 6 14 385 SEQ ID NO: 9746 0.11% 6 15 47 SEQ ID NO: 9747 0.07% 4 16 66 SEQ ID NO: 9748 0.07% 4 17 95 SEQ ID NO: 9749 0.07% 4 18 104 SEQ ID NO: 9750 0.07% 4 19 152 SEQ ID NO: 9751 0.07% 4 20 158 SEQ ID NO: 9752 0.07% 4

[1686] ТАБЛИЦА-США-00090 Таблица 26 Клонированные последовательности для экспрессии E. coli Клонирование длины ДНК ORF bp pET pGEX P28 537 NdeI / XhoI P65 1917 NheI/HindIII Nsp1A 2495 NheI/XhoI Nsp1B 2153 NdeI / XhoI Nsp1C 2612 NdeI / XhoI Nsp2A 431 NdeI / XhoI BamHI/XhoI Nsp2B 426 NdeI / XhoI BamHI/XhoI Nsp3 870 NdeI / XhoI Nsp4 249 NdeI / XhoI BamHI/XhoI Nsp5 594 NheI/XhoI Nsp6 339 NdeI / XhoI BamHI/XhoI Nsp7 417 NdeI / XhoI BamHI/XhoI Nsp9A 1385 NheI/XhoI Nsp9B 1409 NdeI / XhoI Nsp10 1803 NheI/XhoI Nsp11 1581 NdeI / XhoI Nsp12 1038 NdeI / HindIII Nsp13 897 NdeI / XhoI Спайк (S1) 1946 NdeI / XhoI Шип (S2) 1598 NdeI / XhoI Шип (S1-S2) 3545 NdeI / XhoI HR1 287 NdeI / XhoI BamHI/XhoI HR2 146 NdeI / XhoI BamHI/XhoI ОРФ3, ДЕЛЬТА.100 525 NdeI / XhoI ОРФ4 465 NdeI / XhoI Конверт (E) 231 NdeI / XhoI BamHI/XhoI Матрица (M), ДЕЛЬТА.100 366 NdeI / XhoI BamHI/XhoI ОРФ7, ДЕЛЬТА.18 137 NdeI / XhoI BamHI/XhoI ОРФ8 369 NdeI / XhoI BamHI/XhoI ОРФ9 135 NdeI / XhoI BamHI/XhoI ОРФ10 120 NheI / XhoI BamHI/XhoI ОРФ11 255 NdeI / XhoI BamHI/XhoI Нуклеокапсид (N) 1269 NdeI / EcoRI ОРФ12 297 NdeI / EcoRI BamHI / EcoRI

[1687] ТАБЛИЦА-США-00091 Таблица 27 Грунтовки ORF Forward primer обратный праймер P28 9803 9818 P65 9804 9819 Nsp1A 9805 9820 Nsp1B 9806 9821 Nsp1C 9807 9822 Nsp2 + Nsp3 9808 9823 Nsp4 - Nsp7 9809 9824 Nsp9A 9810 9825 Nsp9B 9811 9826 Nsp10 9812 9827 Nsp11 9813 9828 Nsp12-Nsp13 9814 9829 ORF3-ORF4 9815 9830 Env-ORF10 9816 9831 ORF11-ORF12 9817 9832

[1688] ТАБЛИЦА-США-00092 Таблица 28 Грунтовки ORF Forward primer обратный праймер Nsp2A SEQ ID NO: 9833 SEQ ID NO: 9858 Nsp2B SEQ ID NO: 9834 SEQ ID NO: 9859 Nsp3 SEQ ID NO: 9835 SEQ ID NO: 9860 Nsp4 SEQ ID NO: 9836 SEQ ID NO: 9861 Nsp5 SEQ ID NO: 9837 SEQ ID NO: 9862 Nsp6 SEQ ID NO: 9838 SEQ ID NO: 9863 Nsp7 SEQ ID NO: 9839 SEQ ID NO: 9864 Nsp12 SEQ ID NO: 9840 SEQ ID NO: 9865 Nsp13 SEQ ID NO: 9841 SEQ ID NO: 9866 Spike S1 SEQ ID NO: 9842 SEQ ID NO: 9867 Spike S2 SEQ ID NO: 9843 SEQ ID NO: 9868 Spike S1-S2 SEQ ID NO: 9844 SEQ ID NO: 9869 HR1 SEQ ID NO: 9845 SEQ ID NO: 9870 HR2 SEQ ID NO: 9871 Орф3,ДЕЛЬТА.100 SEQ ID NO: 9847 SEQ ID NO: 9872 Орф4 SEQ ID NO: 9848 SEQ ID NO: 9873 Env E SEQ ID NO: 9849 SEQ ID NO: 9874 Матрица М. Дельта.100 SEQ ID NO: 9850 SEQ ID NO: 9875 Орф7,ДЕЛЬТА.18 SEQ ID NO: 9851 SEQ ID NO: 9876 Орф8 SEQ ID NO: 9852 SEQ ID NO: 9877 Орф9 SEQ ID NO: 9853 SEQ ID NO: 9878 Орф10 SEQ ID NO: 9854 SEQ ID NO: 9879 Орф11 SEQ ID NO: 9855 SEQ ID NO: 9880 Нуклеокапсид N SEQ ID NO: 9856 SEQ ID NO: 9881 Орф12 SEQ ID NO: 9857 SEQ ID NO: 9882

[1689] ТАБЛИЦА-США-00093 Таблица 29 Клонирование, очистка и экспрессия E. coli M. W SARS CoV ORFs Kd клонирование Expr. очищение как P28 19.7 + + его Соль P65 70.3 + + его Соль Nsp1A (N-терм) 91.6 + + его Соль Nsp1B (core) 80.8 + - Nsp1C (С-термин) 95,3 + - Nsp2A (N-термин) 15.8 + + его модули Nsp2B (С-term) 15.5 + + his sol Nsp3 31.9 + - Nsp4 9.1 + + его Соль Nsp5 21.8 + + его Соль Nsp6 12.4 + + его Соль Nsp7 15.3 + + его модули Nsp9A (N-термин) 50.8 + - Nsp9B (С-термин) 51.6 + + his ins Nsp10 66 - Nsp11 58 - Nsp12 38 - Nsp13 32.7 + + его модули Спайк (S1-his) 71.3 + + his ins Спайк (S2-his) 58,6 + - Спайк (S1S2-his) 130 + + его входы HR1 11 + + его входы HR2 5.4 + + его Соль ОРФ3, ДЕЛЬТА.100.отхлебывать.1 19.1 + - ORF4 16.9 + + его ins (trimer) Конверт (E) 34.3 + + GST ins (IB) Матрица (M),ДЕЛЬТА.100 13.3 + + его ins ОРФ7,ДЕЛЬТА.18.отхлебывать.2 31 + + GST sol ОРФ8 39.5 + + GST ins (IB) ОРФ9 30.8 + + GST sol ОРФ10 30.3 + + GST ins (IB) ОРФ11 35.2 + + GST ins (IB) Нуклеокапсид (N) 43.6 + + his ins ОРФ12 36.7 + + его модули

[1690] ТАБЛИЦА-США-00094 Таблица 30 Экспрессия, чистота и выход E. coli Выход очищенности бирки протеина (%) (мг/л) Nsp2A (N-термин) его 95 1.7 Nsp2B (С-термин) его 95 4.1 Nsp4 His 95 12.6 Nsp5 Его 95 5.88 Nsp6 Его 95 8.1 P28 Его 95 1 P65 Его 80 0.553 HR2 его 95 11.9 HR1 его 80 2.64 Nsp1A Его 95 0.267 Шип S1-S2 Его 80 0.381 Матрица M Его 85 12,4 ОРФ7 GST 85 4.9

[1691] ТАБЛИЦА-США-00095 Таблица 31 Грунтовки SEQ ID NO: ранг модель Local (позиция) 10235 F1 1 1 (106) 10236 F2 2 1 (728) 10237 F3 3 1 (112) 10238 F4 5 2 (1331) 10239 F5 6 1 (12) 10240 F6 6 1 (346) 10241 F7 8 1 (904) 10242 F8 9 1 (1016) 10243 F9 9 1 (1015) 10244 F10 9 1 (719) 10245 F11 9 1 (720) 10246 F12 10 1 (724) 10247 R1 2 1 (1283) 10248 R2 4 1 (756) 10249 R3 4 1 (758) 10250 R4 5 2 (259) 10251 R5 6 1 (54) 10252 R6 7 1 (648) 10253 R7 8 1 (948) 10254 R8 8 1 (260) 10255 R9 9 1 (1282) 10256 R10 9 1 (950) 10257 R11 9 1 (756) 10258 R12 10 1 (132)

[1692] ТАБЛИЦА-США-00096 Таблица 32 Грунтовки Баллы Ранговая Модель Локальная Последовательность (Позиция) Список праймеров: (вперед) F1 7 1 SEQ ID NO: 10352 (290) F2 7 1 SEQ ID NO: 10353 (291) F3 7 1 SEQ ID NO: 10354 (294) F4 7 1 SEQ ID NO: 10355 (292) F5 7 1 SEQ ID NO: 10356 (293) F6 9 1 SEQ ID NO: 10357 (198) F7 9 1 SEQ ID NO: 10358 (199) F8 10 1 SEQ ID NO: 10359 (33) F9 11 1 SEQ ID NO: 10360 (200) F10 11 1 SEQ ID NO: 10361 (299) F11 12 1 SEQ ID NO: 10362 (298) F12 12 1 SEQ ID NO: 10363 (297) F13 14 1 SEQ ID NO: 10364 (35) F14 14 1 SEQ ID NO: 10365 (34) F15 16 1 SEQ ID NO: 10366 (300) F16 17 1 SEQ ID NO: 10367 (295) F17 17 1 SEQ ID NO: 10368 (296) F18 17 1 SEQ ID NO: 10369 (175) F19 17 1 SEQ ID NO: 10370 (36) F20 20 1 SEQ ID NO: 10371 (202) F21 20 1 SEQ ID NO: 10372 (201) F22 28 1 SEQ ID нет: 10373 (204) F23 28 1 SEQ ID NO: 10374 (203) F24 29 1 SEQ ID NO: 10375 (269) F25 29 1 SEQ ID NO: 10376 (268) Список праймеров: (обратный) R1 7 1 SEQ ID NO: 10377 (337) R2 9 1 SEQ ID NO: 10378 (229) R3 11 1 SEQ ID NO: 10379 (230) R4 11 1 SEQ ID NO: 10380 (338) R5 12 1 SEQ ID NO: 10381 (207) R6 12 1 SEQ ID NO: 10382 (338) R7 13 1 SEQ ID NO: 10383 (231) R8 14 1 SEQ ID NO: 10384 (80) R9 14 1 SEQ ID NO: 10385 (232) R10 15 1 SEQ ID NO: 10386 (82) R11 16 1 SEQ ID NO: 10387 (340) R12 17 1 SEQ ID NO: 10388 (83) R13 17 1 SEQ ID NO: 10389 (206) R14 17 1 SEQ ID NO: 10390 (82) R15 17 1 SEQ ID NO: 10391 (337) R16 18 1 SEQ ID NO: 10392 (341) R17 20 1 SEQ ID NO: 10393 (340) R18 20 1 SEQ ID NO: 10394 (233) R19 21 1 SEQ ID NO: 10395 (79) R20 22 1 SEQ ID NO: 10396 (213) R21 28 1 SEQ ID нет: 10397 (236) R22 29 1 SEQ ID NO: 10398 (317) R23 32 1 SEQ ID NO: 10399 (391) R24 35 1 SEQ ID NO: 10400 (57) R25 36 1 SEQ ID NO: 10401 (237) Список праймеров (левая часть): SEQ ID NO.отхлебывать.S: 10402-10433 Список праймеров (правая часть): SEQ ID NO.отхлебывать.S: 10434-10464 Список праймеров (вперед): SEQ ID NO.отхлебывать.S: 10465-10484 Список праймеров (обратный): SEQ ID NO.отхлебывать.S: 10485-10504

[1693] ТАБЛИЦА-США-00097 Таблица 33 Грунтовки Баллы Ранговая Модель Локальная Последовательность (Позиция) Список праймеров: (вперед) F1 1 1 SEQ ID NO: 10580 (637) F2 2 1 SEQ ID NO: 10581 (439) F3 2 1 SEQ ID NO: 10582 (440) F4 3 1 SEQ ID NO: 10583 (729) F5 4 1 SEQ ID NO: 10584 (696) F6 4 1 SEQ ID NO: 10585 (697) F7 4 1 SEQ ID NO: 10586 (113) F8 5 1 SEQ ID NO: 10587 (867) F9 5 1 SEQ ID NO: 10588 (868) F10 5 1 SEQ ID NO: 10589 (869) F11 5 1 SEQ ID NO: 10590 (640) F12 6 1 SEQ ID NO: 10591 (438) F13 6 1 SEQ ID NO: 10592 (437) F14 6 1 SEQ ID NO: 10593 (436) F15 6 1 SEQ ID NO: 10594 (732) F16 6 1 SEQ ID NO: 10595 (635) F17 6 1 SEQ ID NO: 10596 (457) F18 6 1 SEQ ID NO: 10597 (458) F19 6 1 SEQ ID NO: 10598 (636) F20 7 1 SEQ ID NO: 10599 (854) F21 7 1 SEQ ID NO: 10600 (855) F22 7 1 SEQ ID NO: 10601 (581) F23 7 1 SEQ ID NO: 10602 (853) F24 7 1 SEQ ID NO: 10603 (342) F25 7 1 SEQ ID NO: 10604 (343) F26 7 1 SEQ ID NO: 10605 (112) F27 7 1 SEQ ID NO: 10606 (94) F28 7 1 SEQ ID NO: 10607 (642) F29 8 1 SEQ ID NO: 10608 (638) F30 8 1 SEQ ID NO: 10609 (639) F31 8 1 SEQ ID NO: 10610 (730) F32 8 1 SEQ ID NO: 10611 (641) F33 8 1 SEQ ID NO: 10612 (731) F34 8 1 SEQ ID NO: 10613 (326) F35 8 1 SEQ ID NO: 10614 (325) F36 9 1 SEQ ID NO: 10615 (517) F37 9 1 SEQ ID NO: 10616 (701) F38 9 1 SEQ ID NO: 10617 (208) F39 9 1 SEQ ID NO: 10618 (209) F40 9 1 SEQ ID NO: 10619 (702) F41 9 1 SEQ ID NO: 10620 (210) F42 10 1 SEQ ID NO: 10621 (634) F43 10 1 SEQ ID NO: 10622 (694) F44 10 1 SEQ ID NO: 10623 (693) F45 10 1 SEQ ID NO: 10624 (728) F46 10 1 SEQ ID NO: 10625 (695) F47 10 1 SEQ ID NO: 10626 (95) F48 11 1 SEQ ID NO: 10627 (455) F49 11 1 SEQ ID NO: 10628 (456) F50 11 1 SEQ ID NO: 10629 (454) Список праймеров: (обратный) R1 1 1 SEQ ID NO: 10630 (367) R2 1 1 SEQ ID NO: 10631 (666) R3 2 1 SEQ ID NO: 10632 (464) R4 3 1 SEQ ID NO: 10633 (669) R5 3 1 SEQ ID NO: 10634 (750) R6 4 1 SEQ ID NO: 10635 (720) R7 4 1 SEQ ID NO: 10636 (465) R8 4 1 SEQ ID NO: 10637 (370) R9 4 1 SEQ ID NO: 10638 (668) R10 4 1 SEQ ID NO: 10639 (135) R11 5 1 SEQ ID NO: 10640 (901) R12 5 1 SEQ ID NO: 10641 (667) R13 6 1 SEQ ID NO: 10642 (609) R14 6 1 SEQ ID NO: 10643 (464) R15 6 1 SEQ ID NO: 10644 (665) R16 6 1 SEQ ID NO: 10645 (486) R17 6 1 SEQ ID NO: 10646 (356) R18 6 1 SEQ ID NO: 10647 (758) R19 7 1 SEQ ID NO: 10648 (366) R20 7 1 SEQ ID NO: 10649 (368) R21 7 1 SEQ ID NO: 10650 (136) R22 7 1 SEQ ID NO: 10651 (675) R23 7 1 SEQ ID NO: 10652 (366) R24 7 1 SEQ ID NO: 10653 (608) R25 7 1 SEQ ID NO: 10654 (884) R26 7 1 SEQ ID NO: 10655 (120) R27 8 1 SEQ ID NO: 10656 (355) R28 8 1 SEQ ID NO: 10657 (671) R29 8 1 SEQ ID NO: 10658 (756) R30 8 1 SEQ ID NO: 10659 (751) R31 8 1 SEQ ID NO: 10660 (666) R32 9 1 SEQ ID NO: 10661 (242) R33 9 1 SEQ ID NO: 10662 (543) R34 9 1 SEQ ID NO: 10663 (724) R35 9 1 SEQ ID NO: 10664 (482) R36 10 1 SEQ ID NO: 10665 (121) R37 10 1 SEQ ID NO: 10666 (662) R38 10 1 SEQ ID NO: 10667 (750) R39 10 1 SEQ ID NO: 10668 (719) R40 10 1 SEQ ID NO: 10669 (242) R41 11 1 SEQ ID NO: 10670 (484) R42 11 1 SEQ ID NO: 10671 (375) R43 11 1 SEQ ID NO: 10672 (728) R44 11 1 SEQ ID NO: 10673 (373) R45 11 1 SEQ ID NO: 10674 (998) R46 11 1 SEQ ID NO: 10675 (486) R47 12 1 SEQ ID NO: 10676 (881) R48 12 1 SEQ ID NO: 10677 (882) R49 12 1 SEQ ID NO: 10678 (244) R50 12 1 SEQ ID NO: 10679 (1003) Список праймеров (левая часть): SEQ ID NO.отхлебывать.S: 10680-10974 Список праймеров (правая часть): SEQ ID NO.отхлебывать.S: 10975-11282 Список праймеров (вперед): SEQ ID NO.отхлебывать.S: 11283-11302 Список праймеров (обратный): SEQ ID NO.отхлебывать.S: 11303-11322

[1694] ТАБЛИЦА-США-00098 Таблица 34 Соединение # Имя структуры МН+ 1 # # STR58## N-метил-4-[(2-[(1- метилэтил) фенил] амино) - 1Н-бензимидазол-5-Ил]Окси]пиридин-2-карбоксамид 402,5 2 # # STR59## N-метил-4 - [(1-метил-2 - (3- [(триметилсилил)этинил]фенил)амино)-1Н-бензимидазол-5- yl] оху]пиридин-2-карбоксамид 470,6 3 # # STR60## N-метил-4 - [(1-метил-2 - [(2 - (фенилкарбонил)фенил]амино) - 1Н-бензимидазол-5-Ил]Окси]пиридин-2-карбоксамид 478,5 4 # # STR61## 4-(метилокси) - N - [6 - (метилокси) - 1,3-бензотиазол-2- ил] - 3-нитробензамид 360,4 5 # # STR62## 4-[(2-[(4-бутилфенил) амино) - 1,3-бензотиазол-5-Ил]Окси) - N- метилпиридин-2-карбоксамид 433,5 6 # # STR63## N-метил-4 - ((1-метил-2 - [(6-пирролидин-1-илпиридин-3-Ил) амино]-1Н-бензимидазол - 5-Ил]Окси) пиридин-2-карбоксамид 444,5 7 # # STR64## 4-[(2-[1,1'-Би(циклогексил) - 2-иламино) - 1-метил-1Н- бензимидазол-5-Ил]Окси) - N-метилпиридин-2-карбоксамид 462,6 8 # # STR65## 4-[(2-[(4-хлорфенил) амино) - 1-метил-1Н-бензимидазол-5- Ил]Окси) - N-1,3-тиазол-2-илпиридин-2-карбоксамид 477,9 9 # # STR66## 4 - [(1-метил-2 - [(2 - (метилокси) фенил]амино) - 1Н-бензимидазол-5-Ил]Окси) - N - [3 - (метилокси)пропил]пиридин-2-карбоксамид 462,5 10 # # STR67## 4-[(2-[(4-этилфенил) амино) - 1,3-бензоксазол-5-Ил]Окси) - N- метилпиридин-2-карбоксамид 389,4 11 # # STR68## 1 - [(3-фторфенил) карбонил]-4- [[4-(трифторметил)фенил]метил]пиридин-2-карбоксамид 367,4 12 # # STR69## 1 - [2 - (этилокси) фенил]-4- [[3,4,5-Трис (метилокси)фенил]карбонил]Пиперазин 401,5 13 # # STR70## 1-(3-хлорфенил) - 4 - [(2 - (этилокси) фенил) карбонил]Пиперазин 345,8 14 # # STR71## 3-[(4-[(2е)-3-фенилпроп-2- енил]Пиперазин-1-Ил]карбонил) - 7-оксабицикло[2.2.1]гептан-2-карбоновая кислота 371,4 15 # # STR72## 1 - [2 - (метилокси) фенил] - 4 - [(3,4,5-Трис(метилокси) фенил) карбонил]Пиперазин 387,4 16 # # STR73## 3 - [(4-пиридин-2-илпиперазин-1- Ил) карбонил] - 7-оксабицикло[2.2.1]гептан-2-карбоновая кислота 332,4 17 # # STR74## 3-лентил-7 - [(4-фенилпиперазин- 1-Ил) карбонил]-2-тиоксо-2,3-дигидрохиназолин-4(1Н) - он 437,6 18 # # STR75## 1 - [(Е)-{(4-[(2,4-диметил- фенил) метил]Пиперазин-1-Ил)имино)метил]нафталин-2-ол 374,5 19 # # STR76## 5-хлор-1 - [(3- (трифторметил)фенил)метил]-1Н-индол-2,3-Дион 340,7 20 # # STR77## 1 - [(4-

метилфенил)метил] - 5-нитро-1Н-индол-2,3-Дион 297,3 21 ## STR78## 1-метил-6,7-бис (метилокси)-2- {[3-(метилокси) фенил]карбонил} - 1,2,3,4-тетрагидроизохинолин 342,4 22 ## STR79## 1-метил-6,7-бис (метилокси) - 2- (нафталин-2-илкарбонил)- 1,2,3,4-тетрагидроизохинолин 362,4 23 ## STR80## [2 - (трифторметил)фенил]метил 3 - [4 - (аминокарбонил) фенил]-2-циклогептил-1-оксо-1,2,3,4-тетрагидроизохинолин- 4-карбоксилат 565,6 24 ## STR81## Антра[1,2,5]диазоол-6,11-Дион 267,3 25 ## STR82## # бензо [b]оксантрен-6,11-Дион 265,2 26 ## STR83## # этил 6,11-диоксо-6,11-дигидробензо [b]феназин-2- карбоксилат 333,3 27 ## STR84## N,N-диметил-9,10-диоксо-9,10-дигидроантрацен-1- сульфонамид 316,3 28 ## STR85## 2-(трифторметил) - 3 - {[3,4,5- Трис (метилокси)фенил] карбонил}нафто[2,3-b]фуран-4,9-Дион 461,4 29 ## STR86## 2-(2-оксопропил) - 2-фенил-1Н-Инден-1,3 (2Н)-Дион 279,3 30 ## STR87## этил 4 - {5 - [(3-нитрофенил)карбонил]-1,3- диоксо-1,3-дигидро-2Н-изоиндол-2-Ил]бензоат 445,4 31 ## STR88## 5,6-дихлор-2 - [2-хлор-5 - (трифторметил)фенил] - 1Н-изоиндол-1,3 (2Н)-Дион 395,6 32 ## STR89## 3-бром-4 - {[2-(фторфенил)метил]Окси}-5-(метилокси)бензальдегид тиосемикарбазон 413,3 33 ## STR90## 2-[4-(3-хлорфенил)Пиперазин-1-Ил] - 5-нитробензальдегид тиосемикарбазон 419,9 34 ## STR91## 4- {[2-(3-хлорфенил) этил] амина} - 3-нитробензальдегид тиосемикарбазон 378,9 35 ## STR92## (1Е)-6,9-диметил-2,3,4,9-тетрагидро-1Н-карбазол-1-он тиосемикарбазон 287,4 36 ## STR93## (2Е)-1,1'-bi (циклогексан)-1-Ен-2 - он тиосемикарбазон 252,4 37 ## STR94## 4- {[2-(4-хлорфенил) этил] амина} - 3- нитробензальдегид тиосемикарбазон 378,9 38 ## STR95## 4-(диэтиламино) - 2 - {[4- фторфенил] метил}Окси]бензальдегид N-(2-пиперидин-1- ylethyl)тиосемикарбазон 486,7 39 ## STR96## 3,4-бис (метилокси)бензальдегид (1,1-диоксидо-1,2-бензизотиазол-3-Ил) (метил)гидразон 360,4 40 ## STR97## (2Е)-2 - [(4-хлорфенил) (5- хлоротиен-2-Ил) метилиден]гидразинкарбоксимидамид 314,2 41 ## STR98## 2-(4-амино-2-оксо-1-пропил-1,2-дигидрохинолин-3-Ил) - 1Н- бензимидазол-6-карбонитрил 344,4 42 ## STR99## 4-амино-6-фтор-7-([4- (метилокси) фенил]метил)амино)-3-[5-(4-метилпиперазин-1-Ил)-1Н-бензимидазол-2-Ил]хинолин-2 (1Н)-он 528,6 43 ## STR100## 6-хлор-3-(5-хлор-1Н-бензимидазол-2-Ил) - 4 - {[2-(диметиламино)этил] амина} хинолин-2(1Н) - он 417,3 44 ## STR101## 4-амино-5-(1Н-бензимидазол-2-Ил)-1-метил-1,7-дигидро-6Н- пиразоло[3,4-b]пиримидин-6-он 281,3 45 ## STR102## 5,5-диметил-4-метилиден-3 - (2,4,6-тринитрофенил)-1,3- оксазолидин-2-он 339,2 46 ## STR103## 5-метил-2 - [4 - (метилокси) фенил]гексагидро- 1Н-изоиндол-1,3 (2Н)-Дион 274,3 47 ## STR104## 5-метил-2 - (4-метилфенил)гексагидро-1Н- изоиндол-1,3 (2Н) - Дион 258,3 48 ## STR105## N-2,0 нас.-(4-хлорфенил)-6,6- диметил-1,6-дигидро-1,3,5-триазин-2,4-диамин 252,7 49 ## STR106## (7Z)-7-(фуран-2-илметилиден) - 3-фенил-3,4-дигидро-2Н- [1,3] тиазол[3,2-a][1,3,5]триазин-6 (7Н) - он 312,4 50 ## STR107## (3aR, 9R, 9aR)-6,7-дигидрокси-9-[3,4,5-Трис (метилокси) фенил] - 3а, 4, 9, 9 а-тетрагидронафто[2,3- с]фуран-1 (3Н)-один 387,4 51 ## STR108## 6-хлор-2-(этилокси) - 4-метил- 3-(4-нитрофенил)-3а, 4, 9, 9 а-тетрагидро-3Н-пирроло[2,3-b]хиноксалин 387,8 52 ## STR109## этил 2 - (этилокси) - 4-метил-3а, 4, 9, 9 а-тетрагидро-3Н- пирроло[2,3-b]хиноксалин-3-карбоксилат 304,4 53 ## STR110## этил 4-([2,5-бис (метилокси) фенил]амино)метил]- 3,5-диметил-1Н-пиррол-2-карбоксилат 333,4 54 ## STR111## 1-3-[(6-амино-5-нитропиримидин-2-Ил) амина]пропил] - 4-(2- хлорфенил) - N - [(2S) - 2-гидроксипропил]-1Н-пиррол-3-карбоксилат 473,9 55 ## STR112## (4-метилфенил) (5-нитро-2 - пиперидин-1-илфенил)метанон 325,4 56 ## STR113## (2S, 5R) - н. о.1.о нас.-(4-метил- фенил) - 5-фенил-н.о.2.о нас.-(2-пиридин-2-Ил)пирролидин- 1,2-дихлоркарбоксамид 429,5 57 ## STR114## 2 - [(3S)-3-(ацетиламино) - 2-оксопирролидин-1-Ил] - N - [2-(4- фторфенил) этил]ацетамид 322,4 58 ## STR115## N-[2 - (2,4-дихлорфенил)этил] - 4 - ((Z) - [(4-дифтор- циклогексил) имино][(3S)-3-метилпиперазин-1-Ил] метил) амина) бензамид 553,5 59 ## STR116## 4 - [4 - (метилокси) фенил] - 5-фенилоксазол 252,3 60 ## STR117## метил 4 - [4 - (1-метилэтил)- 2,3-диоксо-7 - (трифторметил) - 3,4-дигидрохиноксалин-1(2Н)- yl] метил]бензоат 421,4 61 ## STR118## (3beta, 16beta) - 3,14,16-тригидроксибуфа-20,22-диенолид 403,5 62 ## STR119## 2-(аминометил) - 1-(2-пиридин-2- Ил)хинозолин-4 (1Н)-он 281,3 63 ## STR120## этил 4 - [5 - [3,4-бис (метилокси) фенил] - 7 - (трифторметил) пиразоло[1,5-а]пиримидин-3- Ил] карбонил]Пиперазин - 1-карбоксилат 508,5 64 ## STR121## 5 - [3,4-бис (метилокси) фенил]-2-(пиперидин-1-илкарбонил) - 7 - (трифторметил)пиразоло[1,5-а]пиримидин 435,4 65 ## STR122## 5 - [3,4-бис (метилокси) фенил] - N- метил-N-(2-пиридин-2 - илтил)-7 - (трифторметил)пиразоло[1,5- а]пиримидин-2-карбоксамид 486,5 66 ## STR123## 5-пропил-2-Тиен-2-илпиразоло[1,5-а]пиримидин-7-ол 260,3

[1695] ТАБЛИЦА-США-00099 КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ПЕРЕЧИСЛЕНИЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ SEQ ID NO: описание 1 проект геномной ассамблеи от научного центра генома в Великобритании Колумбия, Канада последовательности из изолята TOR2. TOR2_draft_genome_assembly_120403 Выпуск 1 2 Последовательность штаммов CDC SARS-CoV. Вся последовательность нуклеотидов (Urban1 напряжение) 3-20 групп-специфические продукты гена коронавируса Вирус инфекционного перитонита кошек (FIPV) 3/4 = ORF 3b; 5/6 = ORF 3X; 7/8 = ORF 3A Коронавирусы собак 9/10 = ORF 7b; 11/12 = ORF 7a Вирус инфекционного бронхита птиц 13/14 = ORF 5b; 15/16 = ORF 5a; 17/18 = ORF 3a; 19/20 = ORF 3b 21-520 500 праймеров для левой части 521-1020 500 праймеры для правой части 1021-3520 прямые грунтолки из таблицы 4 3521-6020 обратные грунты из таблицы 4 6021-6026 рис. 9 праймеров 6027-6033 рис. 11 праймеров 6034-6038 пять праймеров от <http://content.nejm.org/cgi/reprint/NEJMoa030781v2.pdf> 6039-6051 PEP1 to PEP13 6052 расширенный PEP13 6053-6056 229е последовательности коронавируса человека 6057-6060 TGV последовательности 6061-6064 последовательности ПЕДВ 6065-6068 последовательности коронавируса крупного рогатого скота 6069-6071 последовательности вируса гепатита мышей 6072-6075 айбв последовательности 6076-6170 последовательности праймеров (вперед) 6171-6265 последовательности праймеров (обратные) 6266-6304 последовательности праймеров (вперед) 6305-6343 последовательности праймеров (обратные) 6344-6366 последовательности праймеров (вперед) 6367-6392 последовательности праймеров (обратные) 6393-6440 последовательности праймеров (вперед) F1-F48 6441-6487 последовательности праймеров (обратные) R1-R47 6488-6559 последовательности праймеров 6560-6568 последовательности праймеров 6569 последовательность протеиназы nsp2 (3CL-PRO) в коронавирусе SARS 6570-72 протеиназы nsp2 (3CLp) птиц IBV, MHV и BCoV 6573 консенсусная последовательность протеиназы nsp2 6574-6577 последовательности IG от FIG. 18 6578 конструкция выражения nSh в pCMV8 6579 конструкция выражения nS в pCMV8 6580 конструкция выражения nSh .DELTA.TC в pCMV8 6581 конструкция выражения nS .DELTA.TC в pCMV8 6582 конструкция выражения nS1h в pCMV8 6583 конструкция выражения nS1 в pCMV8 6584-6585 праймеры для амплификации кднк 6585-6587 праймеры для РТ-ПЦР 6588-6809 компонентные последовательности фиг. 23 (.гторек.4 аминокислоты) 6810-7179 компонентные последовательности фиг. 24 (.гторек.4 аминокислоты) 7180-7187 сайты N-гликозилирования в пределах SEQ ID NO: 6039 7188-7189 компонентные последовательности фиг. 25 7190 фрагмент SEQ ID NO: 7188 7191 Полинуклеотид, кодирующий SEQ ID NO: 7190 7192 аминокислоты 879-1005 из SEQ ID NO: 6042 7193 аминокислоты 879-980 из SEQ ID NO: 6042 7194 аминокислоты 901-1005 из SEQ ID NO: 6042 7195 аминокислот 1144-1201 из SEQ ID NO: 6042 7196 аминокислот 1144-1196 из SEQ ID NO: 6042 7197-7199 регионы пептида сплавливания мембраны 7200-7206 полипептиды на основе NadA 7207-7223 сайты N-гликозилирования в пределах SEQ ID NO: 6042 7224-7231 регион проскальзывания 7232 Полипротеин Orflab 7233-7244 Полипротеины Орфлаб 7245-7247 X. sub.2 последовательности для SEQ ID NOS 7233-7244 7248-7253 полипротеины Орфлаб 7254 гинк связующий регион 2 Сайт 7255-7271 сайты N-гликозилирования в SEQ ID NOS: 6040-41, 6043, 6045-46, 6050-51 7272-7291 полипептиды и полинуклеотиды 7292-7293 Интергенные последовательности 7294-7301 нуклеотиды из 5' конца генома SARSV, за которыми следуют интергенные последовательности 7302-7306 нада строит 7307-7308 фрагменты SEQ ID NO: 6042 7309 nada последовательность 7310-7311 nada лидер последовательности 7312-7315 аминокислотные последовательности из NadA 7316-7324 ПЦР-праймеры 7325-7330 праймеры 7331 последовательность CCACC 7332-7336 3' UTR передние праймеры 7337-7341 3' UTR обратные праймеры 7342-7352 3' UTR зонды 7353-7362 5' UTR передние праймеры 7363-7373 5' UTR обратные праймеры 7374-7385 5' UTR зонды 7386 консервированный октануклеотид 7387 обратный комплект SEQ ID NO: 7293 7388 Интергенная последовательность 7389 Поли Т 7390 последовательность Стержн-петли 7391-7392 полилициновые линкеры 7393 Полигистидиноый тег 7394 нуклеокапсидный эпитопный сайт 7395 антисмысловый праймер 7396-7397 зонды 7398-7399 антигенные фрагменты SEQ ID NO: 6042 7400-7639 Т-эпитопный анализ SEQ ID NO: 6039 7640-7800 Т-эпитопный анализ SEQ ID NO: 6040 7801-8040 Т-эпитопный анализ SEQ ID NO: 6041 8041-8280 Т-эпитопный анализ SEQ ID NO: 6042 8281-8486 анализ т-эпитопа SEQ ID NO: 6043 8487-8665 Т-эпитопный анализ SEQ ID NO: 6044 8666-8820 Т-эпитопный анализ SEQ ID NO: 6045 8821-9018 Т-эпитопный анализ SEQ ID NO: 6046 9019-9131 Т-эпитопный анализ SEQ ID NO: 6047 9132-9308 Т-эпитопный анализ SEQ ID NO: 6048 9309-9437 Т-эпитопный анализ SEQ ID NO: 6049 9438-9538 Т-эпитопный анализ SEQ ID NO: 6050 9539-9752 Т-эпитопный анализ SEQ ID NO: 6052 9753-9763 праймеры для амплификации спайкового белка, в частности фрагментов из Спайка 9764-9765 сайты N-гликозилирования в пределах SEQ ID NO: 6039 9766-9779 продукты расщепления для OrFlab (таблица 10) 9780-9782 передний праймер, обратный праймер, зонд 9783-9784 богатый лизином регион 9785-9798 олигонуклеотиды, используемые для экспрессии S. cerevisiae 9799-9802 последовательности из фиг. 65 & 66 9803-9882 праймеры для клонирования E. coli 9883-9885 BCV нуклеотидные последовательности для фиг. 3А, 3В, 3С 9886-9891 аминокислотные последовательности BCV для фиг. 4А, 4В, 4С, 4Д, 4Е, 4F 9892 BCV 3' UTR 9894-9896 mhv нуклеотидные последовательности для фиг. 3А, 3В, 3С 9897-9902 аминокислотные последовательности MHV для фиг. 4А, 4В, 4С, 4Д, 4Е, 4F 9903-9904 айбв нуклеотидные последовательности для фиг. 3А, 3В 9905-9909 аминокислотных последовательностей AIBV для фиг. 4А, 4В, 4Д, 4Е, 4F 9910 AIBV 5' UTR 9911 AIBV 3' UTR 9912-9913 НОВМПРО, НОВНЕГА нуклеотидные последовательности для фиг. 3В, 3С 9914-9918 человеческие аминокислотные последовательности CoV для фиг. 4А, 4В, 4С, 4Е, 4F 9919 HCoV-OC43 5' UTR 9920 HCoV-OC43 3' UTR 9921-9923 векторы pCMVkin2 9924-9926 кодон-оптимизированные последовательности N, M и E 9927 BNI-1 9928-9959 составные аминокислотные последовательности .гторек.4aa выводится из SEQ ID NET: 9927 9960 вариант ORF1ab 9961 вариант ORF1a 9962 вариант шипа Вариант мембраны 9963 9964 нуклеокапсидный вариант 9965-9966 Короткие Орфы 9967 FRA полный геном

[1696] ТАБЛИЦА-США-00100 Таблица 35 Ком- фунт # Структура Источник Литература Ссылка Номер Патента 1 ## STR124## Aventis Pasteur 1) Lang. J.-M.; Touraine, J.-L.; Trepo, C. et al. Lancet 1988, 2(8613): 702-5. 2 ## STR125## Pfizer Dong, M. K. et al. Фармаколог 1988, 30 (3): Abst 87.8. ES 8602792 3 ## STR126## Mitsui Chemicals Mizuno, O. et al. 4th Int Conf Иммунофармакол (15-19 мая, Осака) 1988, Abst WS6-3. EP 236929 4 ## STR127## Roche EP

407788 5 ## STR128## Fujisawa 1) Iwami, M. et al. Дзюба 1987, 40(5): 612-22. JP 87161796 6 ## STR129## Novartis FR 2604177 7 ## STR130## Roche Bioscience US 4725622 8 ## STR131## Roche Bioscience US 4727069 9## STR132 ## Сумитомо 1) Нисикаку, Ф. и Кора. Y. 4th Int Conf Иммунофармакол (15-19 мая, Осака) 1988, Abst WS6-8. EP 248399 10 ## STR133## SSP JP 88022053 11 ## STR134## Roche Bioscience US 4725622 12 ## STR135## Taisho 1) Kameo, K. et al. Хим Фарм Булл 1988, 36(6): 2050-60. EP 164101 13 ## STR136## Novartis FR 2604177 14 ## STR137## Novartis FR 2604177 15 ## STR138## Novartis FR 2604177 16 ## STR139## Novartis FR 2604177 17 ## STR140## Novartis FR 2604177 18 ## STR141## Novartis FR 2604177 19 ## STR142## Novartis FR 2604177 ##STR143## 20 ## STR144## ADIR AU 8811669 21 ## STR145## Pharmacia AU 8810908 22 ## STR146## Aventis Pharma EP 284461 23 ## STR147## Eniricerche EP 282891 24 ## STR148## Pharmacia AU 8810908 25 ## STR149## Pharmacia AU 8810908 26 ## STR150## Abbott Swanson, R. N. et al. 28th Intersci Conf Antimicrob Агенты Chemother (23-26 Октября, Лос-Анджелес) 1988, Abst 972. 27 ## STR151## Mitsubishi Pharma JP 88119425 28 ## STR152## Ortho-McNeil EP 292302 29 ## STR153## Eniricerche EP 282891 30 ## STR154## Aventis Pharma EP 284461 31 ## STR155## ADIR AU 8811669 32 ## STR156## ADIR AU 8811669 33 ## STR157## ADIR AU 8811669 34 ## STR158## ADIR AU 8811669 35 ## STR159## ADIR AU 8811669 36 ## STR160## ADIR AU 8811669 37 ## STR161## SSP JP 88022053 38 ## STR162## SSP JP 88022053 39 ## STR163## SSP JP 88022053 40 ## STR164## SSP JP 88022053 41 ## STR165## SSP JP 88022053 42 ## STR166## SSP JP 88022053 43 ## STR167## SSP JP 88022053 44 ## STR168## SSP JP 88022053 45 ## STR169## SSP JP 88022053 46 ## STR170## Ortho-McNeil EP 300741 47 ## STR171## Aventis Pharma 1) Fizames, C. et al. 15th Int Cong Chemother (19-24 июля, Стамбул) 1987, Abst 605 1) GB 2053231 48 ## STR172## Roche Bioscience 1) WHO Drug Inform 1988, 2(4): 227. 1) EP 135376 49 ## STR173## ICN 1) Sharma, B. S. et al. 3-я Международная конференция Intersci World Conf Inflamm, Antirheum Anaig Immunomodul (15-18 Марта, Монте - Карло) 1989, 9. EP 348446 50 ## STR174## Toho Yakuhin 1) Satoru, I. et al. Antivir Res 1988, 9(1-2): 37-46. EP 188697 51 ## STR175## университет Гифу 1) Hasegawa, A. et al. J Carbohydr Chem 1986, 5(3): 371-85. ##STR176## 52 ## STR177## университет Гифу 53 ## STR178## университет Гифу ##STR179## 54 ## STR180## Mitsubishi Pharma EP 351435 55 ## STR181## Aventis Pharma AU 8824582 56 ## STR182## CNRS 1) Chiron, M. et al. Биохим Фармакол 1988, 37(5): 827-36. 57 ## STR183## Aventis Pharma 1) Schorlemmer, H. U.; Bartlett, R. R.; Dickneite, G.; Schwab, W.; Gebert, U.; Sedlacek, H. N. AU 8824195 58 ## STR184## Mitsubishi Pharma JP 88119425 59 ## STR185## Mitsubishi Pharma JP 88119425 60 ## STR186## Mitsubishi Pharma JP 88119425 61 ## STR187## Mitsubishi Pharma JP 88119425 62 ## STR188## микробиологический химический Исследовательский фонд EP 310238 63 ## STR189## Aventis Pharma AU 8824582 64 ## STR190## Aventis Pharma AU 8824582 65 ## STR191## ICN Ramasamy, K. et al. J Med Chem 1989, 32(8): 1905-9. 66 ## STR192## ICN 67 ## STR193## ICN 68 ##STR194## Roche AU 8931653 69 ## STR195## Fujisawa Shibata, T. et al. Джюева 1989, 42(9): 1356-61. 70 ## STR196## Takeda Tanida, S. et al. Джокович 1989, 42(11): 1619. 71 ## STR197## Takeda 72 ## STR198## Aventis Pharma AU 8824195 73 ## STR199## Aventis Pharma AU 8824195 74 ## STR200## Aventis Pharma AU 8824195 75 ## STR201## Aventis Pharma AU 8824195 76 ## STR202## Aventis Pharma AU 8824195 77 ## STR203## Aventis Pharma AU 8824195 78 ## STR204## Aventis Pharma AU 8824195 79 ## STR205## Aventis Pharma AU 8824195 80 ## STR206## Aventis Pharma AU 8824195 81 ## STR207## Aventis Pharma AU 8824195 82 ## STR208## Aventis Pharma AU 8824195 83 ## STR209## Aventis Pharma AU 8824195 84 ## STR210## Aventis Pharma AU 8824195 85 ## STR211## Aventis Pharma AU 8824195 86 ## STR212## Aventis Pharma AU 8824195 87 ## STR213## Aventis Pharma AU 8824195 88 ## STR214## Aventis Pharma AU 8824195 89 ## STR215## Aventis Pharma AU 8824195 90 ## STR216## микробиологический химический Исследовательский фонд EP 310238 91 ## STR217## портовый филиал океанографическое учреждение EP 331320 92 ##STR218## Roche 1) Herrmann. D. B. J. 17th Int Cong Chemother (июнь 23-28, Berlin) 1991, Abst 838. EP 352652 93 ## STR219## Roche AU 8931653 94 ## STR220## Roche AU 8931653 95 ## STR221## Roche AU 8931653 96 ## STR222## Roche AU 8931653 97 ## STR223## Roche AU 8931653 98 ## STR224## Roche AU 8931653 99 ## STR225## Roche AU 8931653 100 ## STR226## Roche AU 8931653 101 ## STR227## Шарпеп 1) Migliorati. G. et al. 7th Int Cong Immunol (30 Июля-5 Августа, Берлин) 1989, Abst 106-62. 102 ## STR228## Mitsubishi Pharma EP 351435 103 ## STR229## Abbott GmbH EP 354693 104 ## STR230## Abbott GmbH EP 354694 105 ## STR231## Wyeth EP 354303 106 ## STR232## Merck & Co. США 4866035

107 ## STR233## Abbott GmbH EP 354693 108 ## STR234## Abbott GmbH EP 354693 109 ## STR235## Abbott GmbH EP 354693 110 ## STR236## Abbott GmbH EP 354694 111 ## STR237## Abbott GmbH EP354694 112 ## STR238## Wyeth EP 354303 113 ## STR239## Wyeth EP 354303 114 ## STR240## Wyeth EP 354303 115 ## STR241## Wyeth EP 354303 116 ## STR242## Wyeth EP 354303 117 ## STR243## Wyeth EP 354303 118 ## STR244## Wyeth EP 354303 119 ## STR245## Wyeth EP 354303 120 ## STR246## Wyeth EP 354303 121 ## STR247## Wyeth EP 354303 122 ## STR248## Wyeth EP 354303 123 ## STR249## Wyeth EP 354303 124 ## STR250## Wyeth EP 354303 125 ## STR251## Wyeth EP 354303 126 ## STR252## Wyeth EP 354303 127 ## STR253## Wyeth EP 354303 128 ## STR254## Tanabe EP 372818 129 ## STR255## Elan 1) Eldon, M. A. et al. J Olin Pharmacol 1990, 30(4): 352-7. 130 ## STR256## Lipha EP 341104 131 ## STR257## Tanabe EP 372818 132 ## STR258## Tanabe EP 372818 133 ## STR259## Tanabe EP 372818 134 ## STR260## Tanabe EP 372818 135 ## STR261## Tanabe EP 372818 136 ## STR262## Tanabe EP 372818 137 ## STR263## Tanabe EP 372818 138 ## STR264## Tanabe EP 372818 139 ## STR265## Tanabe EP 372818 140 ## STR266## Bristol-Myers Squibb US 4935493 141 ## STR267## Takeda JP 90193940 142 ## STR268## Pharmacia EP 429627 143 ## STR269## Merck & Co. EP 393256 144 ## STR270## Merck & Co. EP 393256 145 ## STR271## Merck & Co. EP 393256 146 ## STR272## Merck & Co. EP 393256 147 ## STR273## Bristol-Myers Squibb US 4935493 148 ## STR274## Bristol-Myers Squibb US 4935493 149 ## STR275## Bristol-Myers Squibb US 4935493 150 ## STR276## Bristol-Myers Squibb US 4935493 151 ## STR277## Bristol-Myers Squibb US 4935493 152 ## STR278## Scavo EP 375058 153 ## STR279## SmithKline Beecham AU 9059014 154 ## STR280## американская Биотехнология WO 9102733 155 ## STR281## Novartis EP 417803 156 ## STR282## Polifarma EP 423077 157 ## STR283## SCRAS GB 2228937 158 ## STR284## Santen EP 455833 159 ## STR285## американская Биотехнология WO 9102733 160 ## STR286## Pharmacia EP 429627 161 ## STR287## Pharmacia EP 429627 162 ## STR288## Pharmacia EP 429627 163 ## STR289## Pharmacia EP 429627 164 ## STR290## Pharmacia EP 429627 165 ## STR291## Pharmacia EP 429627 166 ## STR292## Pharmacia EP 429627 167 ## STR293## Pharmacia EP 429627 168 ## STR294## Novartis EP 417803 169 ##STR295## Abbott GmbH WO 9111448 170 ## STR296## Abbott GmbH WO 9112255 171 ## STR297## Leland Stanford Junior University US 4996221 172 ## STR298## Aventis Pharma EP 438813 173 ## STR299## SCRAS GB 2228937 174 ## STR300## SCRAS GB 2228937 175 ## STR301## SCRAS GB 2228937 176 ## STR302## SCRAS GB 2228937 177 ## STR303## SCRAS GB 2228937 178 ## STR304## SCRAS GB 2228937 179 ## STR305## Leland Stanford Junior University US 4996221 180 ## STR306## Leland Stanford Junior University US 4996221 181 ## STR307## Leland Stanford Junior University US 4996221 182 ## STR308## Leland Stanford Junior University US 4996221 183 ## STR309## Leland Stanford Junior University US 4996221 184 ## STR310## Bar-Ilan University 1) Rephaeli, A. et al. Int J Pak 1991, 49(1): 66. EP 302349 185 ##STR311## Abbott GmbH WO 9112255 186 ## STR312## Abbott GmbH WO 9112255 187 ## STR313## Abbott GmbH WO 9111448 188 ##STR314## Abbott GmbH WO 9111448 189 ##STR315## Abbott GmbH WO 9111448 190 ## STR316## Abbott GmbH WO 9111448 191 ## STR317## Abbott GmbH WO 9111448 192 ## STR318## Abbott GmbH WO 9111448 193 ##STR319## Abbott GmbH WO 9111448 194 ##STR320## Abbott GmbH WO 9111448 195## STR321 ## бакирский медицинский университет Дианов В. М. и др. Хуртоп Хим Ж СССР 1991, 25(1): 40. 196 ## STR322## микробиологический химический Исследовательский фонд Кумагай, Н. Е. альг. Джокович 1991, 44(9): 1029. 197## STR323 ## Allergan US 5081261 198 ## STR324## Santen EP 455833 199 ## STR325## Santen EP 455833 200 ## STR326## Allergan US 5081261 201 ## STR327## Allergan US 5081261 202 ## STR328## Allergan US 5081261 203 ## STR329## Allergan US 5081261 204 ## STR330## Ono 1) Satoh, M. et al. 51-й Annu встретиться Jpn Cancer Assoc (29 Сентября-1 Октяб. Осака) 1992, Abst 1450 EP 553786 205## STR331 ## Nowicky 1) Hohenwarter, O.; Strutzenberger, K.; Katinger, H.; Liepins, A.; Nowicky, J. W. Drug Exp Clin 1992, 18(Suppl.): 1. WO 8300486 206 ## STR332## Tanabe US 5210075 ##STR333## 207 ## STR334## Fujisawa 1) Kurimura, M. et al. Pept Chem (1991) 1992, 361. 208## STR335 ## Университет Южной Флориды 1) Hadden, J. W. 5th Intersci Всемирная Конфедерация Ревматологии, Антиретровирусной Терапии, Анальгетиков, Иммуномодуляторов (25-28 Апреля, Женева) 1993, Abst 257. 209 ## STR336## Glycomed WO 9310796 210 ## STR337## Каролинский институт 1) Algarrá, I. et al. Int J Pak 1993, 54: 518. 211 ## STR338## Tanabe US 5210075 ##STR339## 212 ## STR340## Tanabe US 5210075 ##STR341## 213 ## STR342## Santen EP 558287 214 ## STR343## Glycomed WO 9310796 215 ## STR344## Glycomed WO 9310796 216 ## STR345## Glycomed WO 9310796 217 ## STR346## микробиологический химический Исследовательский фонд 218 ## STR347## LEK 1) Sersa, G. et al. Mol Biother 1992, 4: 188. EP 477912 219 ## STR348## микробиологический Фонд исследования химии 1) Уэно, М. et Аль. J Antibiot 1993. 46(5): 719.

220 ## STR349## микробиологический химический Исследовательский фонд 221 ## STR350## Lilly 1) Bartlett, MS. et al. EP 561639 33-й Intersci Conf Антимикробные Средства Химиотерапия (17-20 Октября, New Orleans) 1993, Abst 369. 222 ## STR351## Santen EP 558287 223 ## STR352## Santen EP 558287 224 ## STR353## ADIR EP 572308 225 ## STR354## Santen JP 93239045 226 ## STR355## микробиологический научный фонд Уэно, М. et al. Дж Антибиотик 1993, 46(11): 1658. 227 ## STR356## ADIR EP 572308 228 ## STR357## Leo WO 9401398 229 ## STR358## Leo WO 9401398 230 ## STR359## Leo WO 9401398 231 ## STR360## Santen JP 93239045 232## STR361 ## Kirin Brewery 1) Монта, М. и др. J Med Chem 1995, 38(12): 2176. 1) EP 609437 233 ## STR362## Kirin Brewery 1) EP 609437 234 ## STR363## Kirin Brewery 1) EP 609437 235 ## STR364## Kirin Brewery EP 609437 236 ## STR365## Kirin Brewery EP 609437 ##STR366## 237 ## STR367## Kirin Brewery EP 609437 ##STR368## 238 ## STR369## 3M Pharmaceuticals Lindstrom, K. J. et al. 21th ACS Natl Встреча (24-28 марта, Новый Орлеан) 1996, Abst MEDI 210. США 5482936 239 ## STR370## Roche Bioscience Smith, D. B. et al. J Org Chem 1996, 61(6): 2236. WO 9522538 240 ## STR371## AstraZeneca WO 9611943 241 ## STR372## AstraZeneca WO 9611943 242 ## STR373## AstraZeneca WO 9611943 243 ## STR374## AstraZeneca WO 9611943 244 ## STR375## AstraZeneca WO 9611943 245 ## STR376## AstraZeneca WO 9611943 246 ## STR377## AstraZeneca WO 9611943 247 ## STR378## AstraZeneca WO 9611943 248 ## STR379## AstraZeneca WO 9611943 249 ##

STR380## Peptech WO 9612739 250 ## STR381## японский табак JP 96113555 251 ## STR382## Гарвардский колледж JP 96504177 252 ## STR383## Shire BioChem WO 9619494 253 ## STR384## японский табак JP 96113555 254 ## STR385## японский табак JP 96113555 255 ## STR386## японский табак JP 96113555 256 ## STR387## Shire BioChem WO 9619494 257 ## STR388## Гарвардский колледж JP 96504177 258 ## STR389## Гарвардский колледж JP 96504177 259 ## STR390## Гарвардский колледж JP 96504177 260 ## STR391## Гарвардский колледж JP 96504177 261 ## STR392## Гарвардский колледж JP 96504177 262 ## STR393## Гарвардский колледж JP 96504177 263 ## STR394## японский табак JP 96113555 264 ## STR395## японский табак JP 96113555 265 ## STR396## японский табак JP 96113555 266 ## STR397## Univ. Миннесота WO 9623793 267 ## STR398## Univ. Миннесота WO 9623793 268 ## STR399## Univ. Миннесота WO 9623793 269 ## STR400## Univ. Миннесота WO 9623793 270 ## STR401## Univ. Миннесота WO 9623793 271 ## STR402## AstraZeneca WO 9630397 272 ## STR403## AstraZeneca WO 9630397 273 ## STR404## AstraZeneca WO 9630397 274 ## STR405## AstraZeneca WO 9630397 275 ## STR406## Kyowa Hakko WO 9633989 276 ## STR407## AstraZeneca WO 9630397 277 ## STR408## AstraZeneca WO 9630397 278 ## STR409## AstraZeneca WO 9630397 279 ## STR410## AstraZeneca WO 9630397 280 ## STR411## AstraZeneca WO 9630397 281 ## STR412## AstraZeneca WO 9630397 282 ## STR413## AstraZeneca WO 9630397 283 ## STR414## Glycomed WO 9635700 284 ## STR415## Kyowa Hakko WO 9633989 285 ## STR416## Kyowa Hakko WO 9633989 286 ## STR417## Kyowa Hakko WO 9633989 287 ## STR418## Kyowa Hakko WO 9633989 288 ## STR419## Aston University Kinchington, D. et al. 4-й конф Ретровируссы оппортунистического заражения (22-26 января, Вашингтон, округ Колумбия) 1997 года, Абст. 289 ## STR420## Roche 1) Фидлер-Надь, С. et al. Действие Агента 1989, 27(3-4): 313-5. EP 169571 290 ## STR421## NCFR 1) Forest Laboratories, Inc. Годовой Отчет 1994 Года. WO 9517890 291 ## STR422## Sumitomo Pharmaceuticals EP 248399 292 ## STR423## Aventus Pharma EP 248734 293 ## STR424## May & Baker EP 252682 294 ## STR425## Sumitomo Pharmaceuticals EP 248399 295 ## STR426## Sumitomo Pharmaceuticals EP 248399 296 ## STR427## Sumitomo Pharmaceuticals EP 248399 297 ## STR428## Sumitomo Pharmaceuticals EP 248399 298 ## STR429## Sumitomo Pharmaceuticals EP 248399 299 ## STR430## Sumitomo Pharmaceuticals EP 248399 300 ## STR431## Sumitomo Pharmaceuticals EP 248399 301 ## STR432## Sumitomo Pharmaceuticals EP 248399 302 ## STR433## Aventus Pharma EP 248734 303 ## STR434## Aventus Pharma EP 248734 304 ## STR435## Aventus Pharma EP 248734 305 ## STR436## Aventus Pharma EP 248734 306 ## STR437## Aventus Pharma EP 248734 307 ## STR438## Aventus Pharma EP 248734 308 ## STR439## Pfizer AU 8783281 Найдено 309## STR440## ## портовый филиал. US 4755529 310 ## STR441## Roche Bioscience AU 8782540 311 ## STR442## Roche Bioscience AU 8782540 312 ## STR443## Roche Bioscience AU 8782540 313 ## STR444## Roche Bioscience AU 8782540 314 ## STR445## Novartis EP 296110 315 ## STR446## Novartis 1) Lam, C. et al. Антимикробные Средства Химиотерапия 1991, 35(3): 500. AU 8822785 316 ## STR447## Schering-Plough EP 318214 317 ## STR448## Novartis AU 8822785 318 ## STR449## Novartis AU 8822785 319 ## STR450## Kyorin EP 310096 320 ## STR451## Kyorin EP 310096 321 ## STR452## Kyorin EP 310096 322 ## STR453## Kyorin EP 310096 323 ## STR454## Kyorin EP 310096 324 ## STR455## Kyorin EP 310096 325 ## STR456## Santen EP 326326 326 ## STR457## Roche AU 8929658 327 ## STR458## Taisho 1) Takeshita, K. et al. Int J Immunother 1988, 4(2): 97-106. JP 79141750 Найдено 328## STR459## ## портовый филиал. 1) Bures, N. S. et al. Proc Amer Assoc Cancer Res 1989, 30: Abst 1914. EP 331320 329 ## STR460## Novartis EP 296110 330 ## STR461## Novartis EP 296110 331 ## STR462## Novartis EP 296110 332 ## STR463## Schering-Plough EP 318214 333 ## STR464## Leo WO 8910351 334 ##STR465## Scripps Clinic Res. найдено. WO 8908658

335 ##STR466## Scripps Clinic Res. найдено. WO 8908658 336 ##STR467## Scripps Clinic Res. найдено. WO 8908658 337 ##STR468## Scripps Clinic Res. найдено. WO 8908658 338 ##STR469## Scripps Clinic Res. найдено. WO 8908658 339 ##STR470## Scripps Clinic Res. найдено. WO 8908658 340 ##STR471## Scripps Clinic Res. найдено. WO 8908658 341 ## STR472## Roche AU 8929658 342 ##STR473## Roche AU 8929658 343 ## STR474## Roche AU 8929658 344 ## STR475## Leo WO 8910351 345 ## STR476## Leo WO 8910351 346 ## STR477## Leo WO 8910351 347 ## STR478## Leo WO 8910351 348 ## STR479## Leo WO 8910351 349 ## STR480## Leo WO 8910351 350 ## STR481## Tanabe Seiyaku 1) Уэно, М. и др. Jpn J Фармакол 1992, 58 (Suppl. 1): Абст O-210. AU 8942368 351 ## STR482## Aventus Pharma EP 378456 352 ## STR483## Гринвич Фарм. AU 9047648 353 ## STR484## Roche EP 384349 354 ## STR485## Гринвич Фарм. AU 9047648 355 ## STR486## Гринвич Фарм. AU 9047648 356 ## STR487## Aventus Pharma EP 378456 357 ## STR488## Aventus Pharma EP 378456 358 ## STR489## Aventus Pharma EP 378456 359 ## STR490## Aventus Pharma EP 378456 360 ## STR491## Aventus Pharma EP 378456 361 ## STR492## Aventus Pharma EP 378456 362 ## STR493## Aventus Pharma EP 378456 363 ## STR494## Leo Binderup, L. et al. Биохим Фармакол 1991, 42(8): 1569. EP 460032 364 ##STR495## микробиологический химический Исследовательский фонд Muraoka, Y. et al. 30th Intersci Conf Antimicrob Agents Chemother (21-24 октября, Атланта) 1990, Abst 801 365 ## STR496## Kyorin AU 9057029 366 ## STR497## Гринвич Фарм. AU 9057691 367 ## STR498## Leo EP 460032 368 ## STR499## Leo EP 460032 369 ## STR500## Leo EP 460032 370 ## STR501## Leo EP 460032 371 ## STR502## Leo EP 460032 372 ## STR503## Leo EP 460032 373 ## STR504## Leo EP 460032 374 ## STR505## Novartis Kricek, F. et al. Иммунофармакология 1997, 36(1): 27. AU 9057875 375## STR506## ## Amersham Health 1) Frey, C. L. et al. 31-я Межвузовская конференция Антимикробные Агенты Chemother (29 Сентября-2 Октября, Чикаго) 1991, Abst 85. AU 9059014 376 ## STR507## Roche EP 384349 377 ## STR508## Roche EP 384349 378 ## STR509## Roche AU 9059154 379 ## STR510## Kyorin AU 9057029 380 ## STR511## Гринвич Фарм. AU 9057691 381 ## STR512## Гринвич Фарм. AU 9057691 382 ## STR513## Гринвич Фарм. AU 9057691 383 ## STR514## Гринвич Фарм. AU 9057691 384 ## STR515## Гринвич Фарм. AU 9057691 385## STR516## ## Гринвич Фарм. AU 9057691 386## STR517## ## Гринвич Фарм. AU 9057691 387 ## STR518## Гринвич Фарм. AU 9057691 388 ## STR519## Гринвич Фарм. AU 9057691 389 ## STR520## Гринвич Фарм. AU 9057691 390## STR521## ## Гринвич Фарм. AU 9057691 391 ## STR522## Гринвич Фарм. AU 9057691 392 ## STR523## Гринвич Фарм. AU 9057691 393 ## STR524## Amersham Health AU 9059014 394 ## STR525## Amersham Health AU 9059014 395 ## STR526## Amersham Health AU 9059014 396 ## STR527## Amersham Health AU 9059014 397 ## STR528## Amersham Health AU 9059014 398 ## STR529## Amersham Health AU 9059014 399 ## STR530## Amersham Health AU 9059014 400 ## STR531## Amersham Health AU 9059014 401 ## STR532## Amersham Health AU 9059014 402 ## STR533## Leo 1) Elstner, E. et al. Блад 1994, 84(6): 1960. EP 479871 403 ## STR534## Leo WO 9100855 404 ## STR535## SPA EP 421074 405 ## STR536## Hitachi Chemical EP 421682 406 ## STR537## Roche AU 9059154 407 ## STR538## Roche AU 9059154 408 ## STR539## Roche AU 9059154 409 ## STR540## Roche AU 9059154 410 ## STR541## Roche AU 9059154 411 ## STR542## Fujisawa 1) Manda, T. et al. Jpn J Фармакол 1997, 73 (доп. 1): Абст II-140. EP 412404 412## STR543## Allergan US 5013850 413 ## STR544## Leo WO 9100855 414 ## STR545## Leo WO 9100855 415 ## STR546## Leo WO 9100855 416 ## STR547## Leo WO 9100855 417 ## STR548## Leo EP 479871 418 ## STR549## Leo EP 479871 419 ## STR550## Leo WO 9109841 420## STR551## ## Hitachi Chemical EP 421682 421## STR552## Hitachi Chemical EP 421682 422## STR553## Hitachi Chemical EP 421682 423## STR554## Hitachi Chemical EP 421682 424## STR555## Hitachi Chemical EP 421682 425## STR556## Hitachi Chemical EP 421682 426## STR557## Hitachi Chemical EP 421682 427## STR558## Hitachi Chemical EP 421682 428 ## STR559## SPA EP 421074 429 ## STR560## SPA EP 421074 430 ## STR561## SPA EP 421074 431 ## STR562## SPA EP 421074 432 ## STR563## SPA EP 421074 433 ## STR564## SPA EP 421074 434 ## STR565## SPA EP 421074 435 ## STR566## SPA EP 421074 436 ## STR567## SPA EP 421074 437 ## STR568## SPA EP 421074 438 ## STR569## SPA EP 421074 439 ## STR570## SPA EP 421074 440 ## STR571## SPA EP 421074 441 ## STR572## SPA EP 421074 442 ## STR573## SPA EP 421074 443 ## STR574## SPA EP 421074 444## STR575## ## Allergan US 5013850 445 ## STR576## Allergan US 5013850 446## STR577## Allergan US 5013850 447 ## STR578## Allergan US 5013850 448## STR579## Allergan US 5013850 449 ## STR580## Allergan US 5013850 450 ## STR581## Allergan US 5013850 451 ## STR582## Allergan US 5013850 452 ## STR583## Allergan US 5013850 453 ## STR584## Allergan US 5013850 454 ## STR585## Allergan US 5013850 455 ## STR586## Allergan US 5013850

456 ## STR587## Allergan US 5013850 457 ## STR588## Allergan US 5013850 458 ## STR589## Allergan US 5013850 459 ## STR590## Allergan US 5013850 460## STR591## ## Allergan US 5013850 461 ## STR592## New England Med. Центр Hosp. WO 9116339 462 ## STR593## Leo EP 506794 463 ## STR594## Fujisawa WO 9119708 464 ## STR595## Roche 1) Hill, C. H. 6th SCI-Res Med Chem Symp (Sept 8-11, Cambridge) 1991, Abst S18. EP 384349 465 ## STR596## New England Med. Центр Hosp. WO 9116339 466 ## STR597## Ольях США 5145842 467 ## STR598## Харбор филиал найден. США 5091368 468 ## STR599## Aventus Pharma EP 476658 469 ## STR600## Merck & Co. EP 480713 470## STR601## ## Ольях США 5145842 471 ## STR602## Ольях США 5145842 472 ## STR603## Ольях США 5145842 473 ## STR604## Ольях США 5145842 474 ## STR605## Ольях США 5145842 475## STR606## ## Ольях США 5145842 476 ## STR607## Ольях США 5145842 477 ## STR608## Aventus Pharma EP 476658 478 ## STR609## Aventus Pharma EP 476658 479 ## STR610## Aventus Pharma EP 476658 480 ## STR611## Aventus Pharma EP 476658 481 ## STR612## Aventus Pharma EP 476658 482 ## STR613## Aventus Pharma EP 476658 483 ## STR614## Aventus Pharma EP 476658 484 ## STR615## Aventus Pharma EP 476658 Найдено 485## STR616## ## портовый филиал. США 5091368 486 ## STR617## Merck & Co. EP 480713 487 ## STR618## Merck & Co. EP 480713 488 ## STR619## Merck & Co. EP 480713 489 ## STR620## Merck & Co. EP 480713 490 ## STR621## Kyowa Hakko Miwa, K. et al. 113-я ежегодная встреча Pharmaceut Soc Jpn (29-31 марта, Осака) 1993, Abst 30CC 13-1. EP 505058 491 ## STR622## Roche EP 510473 492 ## STR623## Beaufour-Ipsen 1) Carde, P. et al. Proc Amer Soc Clin Oncol 1991, 10: 00 Abst 324. AU 8810261 493 ## STR624## Roche EP 510473 494 ## STR625## Roche EP 510473 495 ## STR626## Roche EP 510473 496 ## STR627## Fujisawa WO 9218483 497 ## STR628## Kyowa Hakko EP 526840 498 ## STR629## Kyowa Hakko EP 526840 499 ## STR630## Kyowa Hakko EP 526840 500 ## STR631## Aventus Pharma EP 538783 501 ## STR632## Fujisawa Nakamura, K. et al. Хим Фарм Булл 1993, 41(5): 894. AU 8783152 502 ## STR633## Nayashibara 1) Yamamoto, I. et al. 18-й Инт Конг Химиотерапия (27 Июня-2 Июля, Стокгольм) 1993, Abst S16. EP 539196 503 ## STR634## Kyowa Hakko WO 9312116 504 ## STR635## GlaxoSmithKline WO 9314082 505 ## STR636## Otsuka JP 93132484 506 ## STR637## Pfizer США 5236926 507 ## STR638## Aventus Pharma EP 538783 508 ## STR639## Aventus Pharma EP 538783 509 ## STR640## GlaxoSmithKline WO 9314082 510 ##

STR641## GlaxoSmithKline WO 9314082 511 ## STR642## GlaxoSmithKline WO 9314082 512 ## STR643## GlaxoSmithKline WO 9314082 513 ## STR644## GlaxoSmithKline WO 9314082 514 ## STR645## GlaxoSmithKline WO 9314082 515 ## STR646## Otsuka JP 93132484 516 ## STR647## Otsuka JP 93132484 517 ## STR648## Otsuka JP 91132484 518 ## STR649## Otsuka JP 91132484 519 ## STR650## Otsuka JP 93132484 520 ## STR651## Pfizer США 5236926 521 ## STR652## Pfizer США 5236926 522 ## STR653## Pfizer США 5236926 523 ## STR654## Pfizer США 5236926 524 ## STR655## Pfizer США 5236926 525 ## STR656## Суматома США 5258396 526 ## STR657## Wyeth US 5312831 527 ## STR658## клеточная терапия WO 9411001 528 ## STR659## Гринвич Фарм. WO 9411381 529 ## STR660## Otsuka JP 94100561 530 ## STR661## Wyeth US 5312831 531 ## STR662## Wyeth US 5312831 532 ## STR663## клеточная терапия WO 9411001 533 ## STR664## клеточная терапия WO 9411001 534 ## STR665## клеточная терапия WO 9411001 535 ## STR666## клеточная терапия WO 9411001 536 ## STR667## клеточная терапия WO 9411001 537 ## STR668## клеточная терапия WO 9411001 538 ## STR669## клеточная терапия WO 9411001 539 ## STR670## клеточная терапия WO 9416704 540 ## STR671## Immunex 1) Пресс-релиз корпорации Immunex 1994, июль 21. WO 9506031 541 ## STR672## Гринвич Фарм. WO 9411381 542 ## STR673## Гринвич Фарм. WO 9411381 543 ## STR674## Гринвич Фарм. WO 9411381 544 ## STR675## Гринвич Фарм. WO 9411381 545 ## STR676## Гринвич Фарм. WO 9411381 546 ## STR677## Гринвич Фарм. WO 9411381 547 ## STR678## Гринвич Фарм. WO 9411381 548 ## STR679## Гринвич Фарм. WO 9411381 549 ## STR680## Гринвич Фарм. WO 9411381 550 ## STR681## Гринвич Фарм. WO 9411381 551 ## STR682## Гринвич Фарм. WO 9411381 552 ## STR683## Гринвич Фарм. WO 9411381 553 ## STR684## British Technol. GB 2278842 554 ## STR685## клеточная терапия WO 9416704 555 ## STR686## клеточная терапия WO 9416704 556 ## STR687## клеточная терапия WO 9416704 557 ## STR688## клеточная терапия WO 9416704 558 ## STR689## клеточная терапия WO 9416704 559 ## STR690## клеточная терапия WO 9416704 560 ## STR691## клеточная терапия WO 9416704 561 ## STR692## Otsuka JP 94100561 562 ## STR693## Otsuka JP 94100561 563 ## STR694## Otsuka JP 94100561 564 ## STR695## Otsuka JP 94100561 565 ## STR696## Otsuka JP 94100561 566 ## STR697## Otsuka JP 94100561 567 ## STR698## Otsuka JP 94100561 568 ## STR699## Otsuka JP 94100561 569 ## STR700## Otsuka JP 94100561 570 ## STR701## Otsuka JP 94100561 571 ## STR702## Abbott GmbH WO 9500493 572 ## STR703## Abbott GmbH WO 9500507 573 ## STR704## Leo WO 9502577 574 ## STR705## GlaxoSmithKline WO 9504734 575 ## STR706## Kyorin Kono, Y. et al. 115th Annu Meet Pharmaceut Soc Jpn (29-31 Марта, Сендай) 1995, Abst 30 (A3) 10-3. EP 538477 576 ## STR707## Abbott GmbH WO 9500507 577 ## STR708## Abbott GmbH WO 9500507

578 ## STR709## Abbott GmbH WO 9500507 579 ## STR710## Abbott GmbH WO 9500493 580 ## STR711## Abbott GmbH WO 9500493 581 ## STR712## Abbott GmbH WO 9500493 582 ## STR713## Abbott GmbH WO 9500493 583 ## STR714## Abbott GmbH WO 9500493 584 ## STR715## Abbott GmbH WO 9500493 585 ## STR716## Abbott GmbH WO 9500493 586 ## STR717## Abbott GmbH WO 9500493 587 ## STR718## Abbott GmbH WO 9500493 588 ## STR719## Abbott GmbH WO 9500493 589 ## STR720## Abbott GmbH WO 9500493 590 ## STR721## Sanofi-Synthelabo EP 644197 591 ## STR722## Sanofi-Synthelabo CA 2125021 592 ## STR723## Kyowa Hako WO 9509153 593 ## STR724## GlaxoSmithKline WO 9504734 594 ## STR725## GlaxoSmithKline WO 9504734 595 ## STR726## GlaxoSmithKline WO 9504734 596 ## STR727## GlaxoSmithKline WO 9504734 597 ## STR728## GlaxoSmithKline WO 9504734 598 ## STR729## GlaxoSmithKline WO 9504734 599 ## STR730 ## японский табак JP 95002779 600 ## STR731## Pharmacia 1) Gozzi, P. et al. J Pharmacol Exp Ther 1999, 291(1): 199. JP 1995501330 601 ## STR732## Bayer US 5409932 602 ## STR733## Bayer US 5411960 603 ## STR734## Sanofi-Synthelabo EP 644197 604 ## STR735## Sanofi-Synthelabo EP 644197 605 ## STR736## Sanofi-Synthelabo EP 644197 606 ## STR737## Sanofi-Synthelabo CA 2125021 607 ## STR738## Sanofi-Synthelabo CA 2125021 608 ## STR739## Sanofi-Synthelabo CA 2125021 609 ## STR740## Sanofi-Synthelabo CA 2125021 610 ## STR741## Sanofi-Synthelabo CA 2125021 611 ## STR742## Sanofi-Synthelabo CA 2125021 612 ## STR743## Sanofi-Synthelabo CA 2125021 613 ## STR744## Baxter France, C. P. et al. Разработка Лекарственных Препаратов PЭС 1995, 35: 49. EP 396282 614 ## STR745## Bayer US 5411960 615 ## STR746## Bayer US 5411960 616 ## STR747## Bayer US 5411960 617 ## STR748## Байер США 5411960 618 ## STR749## Bayer US 5409932 619 ## STR750## Lilly WO 9517382 620 ## STR751## Millennium WO 9518610 621 ## STR752## Aventis Pharma WO 9520578 622 ## STR753## клеточная терапия WO 9522546 623 ## STR754## Lilly WO 9517382 624 ## STR755## Lilly WO 9517382 625 ## STR756## Lilly WO 9517382 626 ## STR757## Lilly WO 9517382 627 ## STR758## Lilly WO 9517382 628 ## STR759## Lilly WO 9517382 629 ## STR760## Lilly WO 9517382 630 ## STR761## Lilly WO 9517382 631 ## STR762## Lilly WO 9517382 632 ## STR763## CytoMed WO 9518610 633 ## STR764## CytoMed WO 9518610 634 ## STR765## CytoMed WO 9518610 635 ## STR766## CytoMed WO 9518610 636 ## STR767## CytoMed WO 9518610 637 ## STR768## CytoMed WO 9518610 638 ## STR769## CytoMed WO 9518610 639 ## STR770## CytoMed WO 9518610 640 ## STR771## CytoMed WO 9518610 641 ## STR772## CytoMed WO 9518610 642 ## STR773## CytoMed WO 9518610 643 ## STR774## CytoMed WO 9518610 644 ## STR775## CytoMed WO 9518610 645 ## STR776## CytoMed WO 9518610 646 ## STR777## CytoMed WO 9518610 647 ## STR778## CytoMed WO 9518610 648 ## STR779## CytoMed WO 9518610 649 ## STR780## CytoMed WO 9518610 650 ## STR781## Duphar EP 664287 651 ## STR782## японский табак JP 95002779 652 ## STR783## японский табак JP 95002779 653 ## STR784## японский табак JP 95002779 654 ## STR785## японский табак JP 95002779 655 ## STR786## японский табак JP 95002779 656 ## STR787## японский табак JP 95002779 657 ## STR788## японский табак JP 95002779 658 ## STR789## японский табак JP 95002779 659 ## STR790## Aventis Pharma WO 9520578 660 ## STR791## Aventis Pharma WO 9520578 661 ## STR792## Aventis Pharma WO 9520578 662 ## STR793## Aventis Pharma WO 9520578 663 ## STR794## Kyowa Hako WO 9509153 664 ## STR795## Kyowa Hako WO 9509153 665 ## STR796## Kyowa Hako WO 9509153 666 ## STR797## Kyowa Hako WO 9509153 667 ## STR798## Kyowa Hako WO 9509153 668 ## STR799## Kyowa Hako WO 9509153 669 ## STR800## Kyowa Hako WO 9509153 670 ## STR801## Sanofi-Synthelabo WO 9526958 671 ## STR802## клеточная терапия WO 9522546 672 ## STR803## клеточная терапия WO 9522546 673 ## STR804## клеточная терапия WO 9522546 674 ## STR805## клеточная терапия WO 9522546 675 ## STR806## клеточная терапия WO 9522546 676 ## STR807## клеточная терапия WO 9522546 677 ## STR808## Duphar EP 664287 678 ## STR809## Duphar EP 664287 679 ## STR810## Duphar EP 664287 680 ## STR811## Duphar EP 664287 681 ## STR812## Duphar EP 664287 682 ## STR813## Duphar EP 664287 683 ## STR814## Sanofi-Synthelabo WO 9529672 684 ## STR815## Sanofi-Synthelabo WO 9526958 685 ## STR816## Sanofi-Synthelabo WO 9526958 686 ## STR817## Takeda WO 9535296 687 ## STR818## вершина WO 9535308 688 ## STR819## Daikin EP 711766 689 ## STR820## Sanofi-Synthelabo WO 9533751 690 ## STR821## Entropin WO 9534561 691 ## STR822## Takeda WO 9535296 692 ## STR823## Takeda WO 9535296 693 ## STR824## Takeda WO 9535296 694 ## STR825## Takeda WO 9535296 695 ## STR826 ## вершина WO 9535308 696 ## STR827## вершина WO 9535308 697 ## STR828 ## вершина WO 9535308 698 ## STR829## Ajinomoto US 5464819 699 ## STR830## Sanofi-Synthelabo WO 9529672 700 ## STR831## Sanofi-Synthelabo WO 9529672 701 ## STR832## Sanofi-Synthelabo WO 9529672

702 ## STR833## 3M Pharmaceuticals US 5482936 703 ## STR834## 3M Pharmaceuticals US 5482936 704 ## STR835## 3M Pharmaceuticals US 5482936 705 ## STR836## 3M Pharmaceuticals US 5482936 706 ## STR837## Entropin WO 9534561 707 ## STR838## Entropin WO 9534561 708 ## STR839## Entropin WO 9534561 709 ## STR840## Entropin WO 9534561 710 ## STR841## Entropin WO 9534561 711 ## STR842## Entropin WO 9534561 712 ## STR843 ## Entropin WO 9534561 713 ## STR844## Ajinomoto US 5464819 714 ## STR845## Ajinomoto US 5464819 715 ## STR846## Ajinomoto US 5464819 716 ## STR847## Sanofi-Synthelabo WO 9533751 717 ## STR848## Sanofi-Synthelabo WO 9533751 718 ## STR849## Sanofi-Synthelabo WO 9533751 719 ## STR850## Sanofi-Synthelabo WO 9533751 720 ## STR851## Sanofi-Synthelabo WO 9533751 721 ## STR852## Sanofi-Synthelabo WO 9533751 722 ## STR853## Daikin EP 711766 723 ## STR854## Daikin EP 711766 724 ## STR855## Daikin EP 711766 725 ## STR856## Daikin EP 711766 726 ## STR857## Taisho 1) Yoshida, H. et al. Биол Фарм Булл 1997, 20(1): 94. JP 93051358 727 ## STR858 ## микробиологический химический Исследовательский фонд JP 96176157

[1697] ТАБЛИЦА-США-00101 728 ## STR859## Sankyo Shiozaki, M. et al. Тетраэдр Lett 1996 37(40): 7271. 729 ## STR860## Nippon Kayaku JP 96283290 730 ## STR861## Tanabe WO 9640641 731 ## STR862## Tanabe WO 9640641 732 ## STR863## Daiichi Pharma-ceutical 1) Кавагоэ, К. и др. AFMC Int Med Chem Symp (Sept 3-8, Tokyo) 1995, Abst P13M183. JP 97059236 733 ## STR864## вершина WO 9722618 734 ## STR865## вершина WO 9722618 735 ## STR866 ## вершина WO 9722618 736 ## STR867 ## вершина WO 9722618 737 ## STR868## вершина WO 9722618 738 ## STR869## вершина WO 9722618 739 ## STR870## Astra Zeneca WO 9731023 740 ## STR871## Университет Пенсильвании-sylvania WO 9733603 741 ## STR872## Eisai EP 889032 742 ## STR873## AWD. pharma WO 9734874 743 ## STR874## Astra Zeneca WO 9731023 744 ## STR875 ## Astra Zeneca WO 9731023 745 ## STR876 ## Astra Zeneca WO 9731023 746 ## STR877## Astra Zeneca WO 9731023 747 ## STR878## AWD. pharma WO 9734874 748 ## STR879## AWD. pharma WO 9734874 749 ## STR880## Leo WO 9737972 750 ## STR881## Taisho JP 97194476 751 ## STR882## Leo WO 9737972 752 ## STR883## Leo WO 9737972 753 ## STR884## Leo WO 9737972 754 ## STR885## Leo WO 9737972 755 ## STR886## Leo WO 9737972 756 ## STR887## Glaxo-Smith Kline WO 9743250 757 ## STR888## Astra Zeneca 1) Saem-strand, B. et al. J Pharmacol Exp Ther 1999, 228 (3): 1174. EP 0463514 758 ## STR889## Pharmacia WO 9745409 759 ## STR890## Pharm-acia WO 9745409 760 ## STR891## Pharm-acia WO 9745409 761 ## STR892## Pharm-acia WO 9745409 762 ## STR893## Eisai Nagai, M. et al. 217-я встреча ACS Natl (21-25 марта, Ana-heim) 1999, Abst MEDI 050. EP 889032 763 ## STR894 ## башкирский медицинский университет Садьков Р. Ф. и др. Naunyn-Schmid Arch Pharm-acol 1998, 358(1, Suppl. 2): Abst P 52.28. 764 ## STR895## LEK EP 477912 765 ## STR896## Gruen-enthal EP 856513 766 ## STR897## Gruen-enthal EP 856513 767 ## STR898## Gruen-enthal EP 856513 768 ## STR899## Gruen-enthal EP 856513 769 ## STR900 ## Astra Zeneca WO 9828275 770 ## STR901 ## Astra Zeneca WO 9828275 771 ## STR902## Astra Zeneca WO 9828270 772 ## STR903## Astra Zeneca WO 9828270 773 ## STR904## Astra Zeneca WO 9828270 774 ## STR905## Astra Zeneca WO 9828270 775 ## STR906 ## Astra Zeneca WO 9828270 776 ## STR907## Astra Zeneca WO 9828270 777 ## STR908## Astra Zeneca WO 9828270 778 ## STR909## Astra Zeneca WO

9828270 779 ## STR910## Astra Zeneca WO 9828270 780## STR911 ## Astra Zeneca WO 9828270 781 ## STR912## Astra Zeneca WO 9828270 782 ## STR913## Astra Zeneca WO 9828270 783 ## STR914## Astra Zeneca WO 9828270 784 ## STR915## Astra Zeneca WO 9828270 785## STR916 ## Astra Zeneca WO 9828270 786## STR917 ## Astra Zeneca WO 9828270 787 ## STR918## Astra Zeneca WO 9828270 788## STR919 ## Astra Zeneca WO 9828270 789 ## STR920## Japan Energy JP 98231297 790 ## STR921## Japan Energy JP 98231297 791 ## STR922## Japan Energy JP 98231297 792 ## STR923## Japan Energy JP 98231297 793 ## STR924## Japan Energy JP 98231297 794## STR925 ## Celgene 1) Moreira, A. L. et al. J Нейроонкол 1999, 43(2): 109. Американский Пат. No. 5463063 795 ## STR926## Daiichi Pharma-ceutical Koiwa, T. et al. J Антибиотик 1999, 52(2): 198. 796 ## STR927## Celgene U. S. Pat. No. 5874448 797 ## STR928## Celgene U. S. Pat. No. 5874448 798 ## STR929## Celgene U. S. Pat. No. 5874448 799 ## STR930## Celgene U. S. Pat. No. 5874448 800 ## STR931## Celgene U. S. Pat. No. 5874448 801 ## STR932## Eisai EP 889032 802 ## STR933## Merck & Co. WO 9909984 803 ## STR934## Merck & Co. WO 9909984 804 ## STR935## Merck & Co. WO 9909984 805 ## STR936## Merck & Co. WO 9909984 806 ## STR937## Hokur-iku JP 99080156 807 ## STR938## Hokur-iku JP 99080156 808 ## STR939## Hokur-iku JP 99080156 809 ## STR940## Hokur-iku JP 99080156 810 ## STR941## Hokur-iku JP 99080156 811 ## STR942## SSP CA 2255337 812 ## STR943## SSP CA 2255337 813 ## STR944## SSP CA 2255337 814 ## STR945## Abbott Madar, D. et al. 22-я встреча ACS Natl (26-30 августа, Чикаго) 2001, Abst MEDI 7. EP 1068187 815 ## STR946## Active Biotech WO 9955678 816 ## STR947## Amer-sham 1) Gesser, B. et al. Proc Natl Acad Sci USA 1997, 94(26): 14620. WO 9601318 817 ## STR948## Kowa WO 9944995 818 ## STR949## Kowa WO 9944995 819 ## STR950## Kowa WO 9944995 820 ## STR951## OM Pharma WO 0000462 821 ## STR952## OM Pharma WO 0000462 822 ## STR953## Ono WO 0003980 823 ## STR954## Ono WO 0003980 824 ## STR955## Ono WO 0003980 825 ## STR956## Ono WO 0003980 826 ## STR957## Ono WO 0003980 827 ## STR958## Ono WO 0003980 828 ## STR959## Ono WO 0003980 829 ## STR960## Univer-sity of Bristol WO 0014114 830 ## STR961## Eisai Hibi, S. et al. Bioorg Med Chem Lett 2000, 10(7): 623. EP 0889032 831 ##STR962## Janssen WO 0021959 832 ## STR963## Янссен WO 0021959 833 ## STR964## Янссен WO 0021959 834 ## STR965## Янссен WO 0021959 835 ## STR966## Fuji-sawa WO 0021979 836 ## STR967## Abbott 1) Liu, G. et al. 22-я встреча ACS Natl (20-24 августа, Вашингтон, округ Колумбия) 2000, Abst MEDI 171. 1) США Пат. No. 6110922 837 ## STR968## Рак повторный поиск UK WO 0052046 838 ## STR969## Рак повторный поиск UK WO 0052046 839 ## STR970## Рак повторный поиск UK WO 0052046 840 ## STR971## Южно-эрнский институт повторного поиска WO 0112197 841 ## STR972## Южно-эрнский институт повторного поиска WO 0112197 842 ## STR973## Abbott Labs. EP 1068187 843 ## STR974## Abbott EP 1068187 844 ## STR975## Abbott EP 1068187 845 ## STR976## Fuji-sawa Spears, G. et al. 21st Symp Med Chem (Nov 28-30, Kyoto) 2001, Abst 2P-29.

846 ## STR977## Austin Re-search Institute Tselios, T. et al. J Med Чех 2002, 45(2): 275. 847 ## STR978## Eukar-ion WO 0204454 848 ## STR979## Nobex 1) Riggs - Sauthier, J. A. et al. 224th ACS Natl Встреча (18-22 августа, Бостон) 2002, Abst MEDI 305. WO 0218324 849 ## STR980## Tularik WO 0238107 850 ## STR981## Tularik WO 0238107 851 ## STR982## Tularik WO 0238107 852 ## STR983## Tularik WO 0238107 853 ## STR984## Tularik WO 0238107 854 ## STR985## Tularik WO 0238107 855 ## STR986## Tularik WO 0238107 856 ## STR987## Tularik WO 0238107 857 ## STR988## Tularik WO 0238107 858 ## STR989## Sanofi-Synthe labo WO 0242269 859 ## STR990## Sanofi-Synthe labo WO 0242269 860 ## STR991## Sanofi-Synthe labo WO 0242269 861 ## STR992## Sanofi-Synthe labo WO 0242269 862 ## STR993## Sanofi-Synthe labo WO 0242269 863 ## STR994## Sanofi-Synthe labo WO 0242269 864 ## STR995## Sanofi-Synthe labo WO 0242269 865 ## STR996## Sanofi-Synthe labo WO 0242269 866 ## STR997## Sanofi-Synthe labo WO 0242269 867 ## STR998## Bristol-Myers Squibb WO 0244181 868 ## STR999## Bristol-Myers Squibb WO 0244181 869 ## STR1000## Bristol-Myers Squibb WO 0244181 870 ## STR1001## Bristol-Myers Squibb WO 0244181 871 ## STR1002## Bristol-Myers Squibb WO 0244181 872 ## STR1003## Bristol-Myers Squibb WO 0244181 873 ## STR1004## Bristol-Myers Squibb WO 0244181 874 ## STR1005## Bristol-Myers Squibb WO 0244181 875 ## STR1006## Bristol-Myers Squibb WO 0244181 876 ## STR1007## ячейка Thera-peutics WO 0268421 877 ## STR1008## ячейка Thera-peutics WO 0268421 878 ## STR1009## Gruenenthal WO 0290317 881 ## STR1010## May & Baker EP 252682 882 ## STR1011## Kyorin EP 310096 883 ## STR1012## Kyorin EP 310096 884 ## STR1013## Kyorin EP 310096 885 ## STR1014## Kyorin EP 310096 886 ## STR1015## Kyorin EP 310096 887 ## STR1016## Kyorin EP 310096 888 ## STR1017## Santen EP 326326 889 ## STR1018## Roche AU 8929658 890 ## STR1019## Taisho 1) Takeshita, K. et al. Int J Immunother 1988, 4(2): 97-106. JP 79141750 Найдено 891 ##STR1020## портовый филиал. 1) Burres, N. S. et al. Proc Amer Assoc Cancer Res 1989, 30: Abst 1914. EP 331320 Найдено 892 ##STR1021## Scripps Clinic Res. WO 8908658 893 ##STR1022## Scripps Clinic Res. найдено. WO 8908658 894 ##STR1023## Scripps Clinic Res. WO 8908658 895 ##STR1024## Scripps Clinic Res. найдено. WO 8908658 896 ##STR1025## Scripps Clinic Res. найдено. WO 8908658 Найдено 897 ##STR1026## Scripps Clinic Res. WO 8908658 Найдено 898 ##STR1027## Scripps Clinic Res. WO 8908658 899 ## STR1028## Roche AU 8929658 900 ## STR1029## Roche AU 8929658 901 ## STR1030## Roche AU 8929658 902 ## STR1031## Aventis Pharma EP 378456 903 ## STR1032## Roche EP 384349 904 ## STR1033## Green-wich Pharm. AU 9047648 905 ## STR1034## Aventis Pharma EP 378456 906 ## STR1035## Aventis Pharma EP 378456 907 ## STR1036## Aventis Pharma EP 378456 908 ## STR1037## Aventis Pharma EP 378456 909 ## STR1038## Aventis Pharma EP 378456 910 ## STR1039## Leo Binderup, L. et al. Биохим Фармакол 1991, 42(8): 1569. EP 460032 911 ## STR1040## Micro-bial Chem-istry RE - search found Muraoka, Y. et al. 30th Intersci Conf антимикробные агенты химиотерапия (Октябрь 21-24, Atlanta) 1990, Abst 801. 912 ## STR1041## Kyorin AU 9057029 913 ## STR1042## Green-wich Pharm. AU 9057691 914 ## STR1043## Leo EP 460032 915 ## STR1044## Leo EP 460032 916 ## STR1045## Leo EP 460032 917 ## STR1046## Leo EP 460032 918 ## STR1047## Leo EP 460032 919 ## STR1048## Leo EP 460032 920 ## STR1049## Leo EP 460032 921 ## STR1050## Novar-tis Kriccek, F. et al. Иммунофармакол-ОГ 1997, 36(1): 27. AU 9057875 922 ## STR1051## Amer-sham Health 1) Frey, C. L. et al. 31-й Intersci Conf Anti-microb Agents Chemother (Sept 29-Oct 2, Chicago) 1991, Abst 85. AU 9059014 923 ## STR1052## Roche EP 384349 924 ## STR1053## Roche AU 9059154 925 ## STR1054## Kyorin AU 9057029 926 ## STR1055## Green-wich Pharm. AU 9057691 927 ## STR1056## Green-wich Pharm. AU 9057691 928 ## STR1057## Green-wich Pharm. AU 9057691 929 ## STR1058## Green-wich Pharm. AU 9057691 930 ## STR1059## Green-wich Pharm. AU 9057691 931 ## STR1060 ## Green-wich Pharm. AU 9057691 932 ## STR1061## Green-wich Pharm. AU 9057691 933 ## STR1062## Green-wich Pharm. AU 9057691 934 ## STR1063## Green-wich Pharm. AU 9057691 935 ## STR1064## Green-wich Pharm. AU 9057691 936 ## STR1065## Green-wich Pharm. AU 9057691 937 ## STR1066## Green-wich Pharm. AU 9057691 938 ## STR1067## Green-wich Pharm. AU 9057691 939 ## STR1068## Amer-sham Health AU 9059014 940 ## STR1069## Amer-sham Health AU 9059014 941 ## STR1070## Amer-sham Health AU 9059014 942 ## STR1071## Amer-sham Health AU 9059014 943 ## STR1072## Amer-sham Health AU 9059014 944 ## STR1073## Amer-sham Health AU 9059014 945 ## STR1074## Amer-sham Health AU 9059014 946 ## STR1075## Amer-sham Health AU 9059014 947 ## STR1076## Amer-sham Health AU 9059014 948 ## STR1077## Leo 1) Elstner, E. et al. Блад 1994, 84(6): 1960. 1) EP 479871 949 ## STR1078## Leo WO 9100855 950 ## STR1079## Roche AU 9059154 951 ## STR1080## Roche AU 9059154 952 ## STR1081## Roche AU 9059154 953 ## STR1082## Roche AU 9059154 954 ## STR1083## Roche AU 9059154 955 ## STR1084## Aller-gan U. S. Pat. No. 5013850 956 ## STR1085## Leo WO 9100855 957 ## STR1086## Leo WO 9100855 958 ## STR1087## Leo WO 9100855 959 ## STR1088## Leo WO 9100855 960 ## STR1089## Leo EP 479871 961 ## STR1090## Leo EP 479871 962 ## STR1091## Aller-gan U. S. Pat. No. 5013850 963 ## STR1092## Aller-gan U. S. Pat. No. 5013850 964 ## STR1093## Aller-gan U. S. Pat. No. 5013850 965 ## STR1094## Aller-gan U. S. Pat. No. 5013850 966 ## STR1095## Aller-gan U. S. Pat. No. 5013850 967 ## STR1096## Aller-gan U. S. Pat. No. 5013850

968 ## STR1097## Aller-gan U. S. Pat. No. 5013850 969 ## STR1098## Aller-gan U. S. Pat. No. 5013850 970 ## STR1099## Aller-gan U. S. Pat. No. 5013850 971 ## STR1100## Aller-gan U. S. Pat. No. 5013850 972 ## STR1101## Aller-gan U. S. Pat. No. 5013850 973 ## STR1102## Aller-gan U. S. Pat. No. 5013850 974 ## STR1103## Aller-gan U. S. Pat. No. 5013850 975 ## STR1104## Aller-gan U. S. Pat. No. 5013850 976 ## STR1105## Aller-gan U. S. Pat. No. 5013850 977 ## STR1106## Aller-gan U. S. Pat. No. 5013850 978 ## STR1107## Aller-gan U. S. Pat. No. 5013850 979 ## STR1108## New England Med. Центр Hosp. WO 9116339 980 ## STR1109## Roche 1) Hill, C. H. 6th SCI-RSC Med Chem Symp (Sept 8-11, Cam-bridge) 1991, Abst S18. EP 384349 981 ## STR1110## New England Med. Центр Hosp. WO 9116339 982 ## STR1111## Adler U. S. Pat. No. 5145842 983 ## STR1112## Adler U. S. Pat. No. 5145842 984 ## STR1113## Adler U. S. Pat. No. 5145842 985 ## STR1114## Adler U. S. Pat. No. 5145842 986 ## STR1115## Adler U. S. Pat. No. 5145842 987 ## STR1116## Adler U. S. Pat. No. 5145842 988 ## STR1117## Adler U. S. Pat. No. 5145842 989 ## STR1118## Adler U. S. Pat. No. 5145842 990 ## STR1119## Roche EP 510473 991 ## STR1120## Beau-four-Ipsen 1) Carde, P. et al. Proc Amer Soc Клиничевич 1991, 10: 32. AU 8810261 992 ## STR1121## Roche EP 510473 993 ## STR1122## Roche EP 510473 994 ## STR1123## Roche EP 510473 995 ## STR1124## Fuji-sawa WO 9218483 996 ## STR1125## Kyowa Hakkо EP 526840 997 ## STR1126## Kyowa Hakkо EP 526840 998 ## STR1127## Kyowa Hakkо EP 526840 999 ## STR1128## Aventus Pharma EP 538783 1000 ## STR1129## Haya-shibara 1) Yama - moto, I. et al. 18-й Инт Cong Химиотерапия (27 Июня-2 Июля, Стокгольм) 1993, Abst 516. EP 539196 1001 ## STR1130## Kyowa Hakkо WO 9312116 1002 ## STR1131## Glaxo Smith Kline WO 9314082 1003 ## STR1132## Otsuka JP 93132484 1004 ## STR1133## Pfizer U. S. Pat. No. 5236926 1005 ## STR1134## Aventus Pharma EP 538783 1006 ## STR1135## Aventus Pharma EP 538783 1007 ## STR1136## Glaxo Smith Kline WO 9314082 1008 ## STR1137## Glaxo Smith Kline WO 9314082 1009 ## STR1138## Glaxo Smith Kline WO 9314082 1010 ## STR1139## Glaxo Smith Kline WO 9314082 1011 ## STR1140## Glaxo Smith Kline WO 9314082 1012 ## STR1141## Glaxo Smith Kline WO 9314082 1013 ## STR1142## Otsuka JP 93132484 1014 ## STR1143## Otsuka JP 93132484 1015 ## STR1144## Otsuka JP 93132484 1016 ## STR1145## Otsuka JP 93132484 1017 ## STR1146## Otsuka JP 93132484 1018 ## STR1147## Pfizer U. S. Pat. No. 5236926 1019 ## STR1148## Pfizer U. S. Pat. No. 5236926 1020 ## STR1149## Pfizer U. S. Pat. No. 5236926 1021 ## STR1150## Pfizer U. S. Pat. No. 5236926 1022 ## STR1151## Pfizer U. S. Pat. No. 5236926 1023 ## STR1152## Sumi-tomo U. S. Pat. No. 5258396 1024 ## STR1153## ячейка Thera-peutics WO 9411001 1025 ## STR1154## Green-wich Pharm. WO 9411381 1026 ## STR1155## Otsuka JP 94100561 1027 ## STR1156## клетка Thera-peutics WO 9411001 1028 ## STR1157## клетка Thera-peutics WO 9411001 1029 ## STR1158## клетка Thera-

peutics WO 9411001 1030 ## STR1159## клетка Thera-peutics WO 9411001 1031 ## STR1160## клетка Thera-peutics WO 9411001 1032 ## STR1161##
ячейка Thera-peutics WO 9411001 1033 ## STR1162## ячейка Thera-peutics WO 9411001 1034 ## STR1163## Green-wich Pharm. WO 9411381 1035 ##
STR1164## Green-wich Pharm. WO 9411381 1036 ## STR1165## Green-wich Pharm. WO 9411381 1037 ## STR1166## Green-wich Pharm. WO 9411381 1038
STR1167## Green-wich Pharm. WO 9411381 1039 ## STR1168## Green-wich Pharm. WO 9411381 1040 ## STR1169## Green-wich Pharm. WO 9411381
1041 ## STR1170## Green-wich Pharm. WO 9411381 1042 ## STR1171## Green-wich Pharm. WO 9411381 1043 ## STR1172## Green-wich Pharm. WO
9411381 1044 ## STR1173## Green-wich Pharm. WO 9411381 1045 ## STR1174## Green-wich Pharm. WO 9411381 1046 ## STR1175## Bristol Tech-nol. GB
2278842 1047 ## STR1176## Otsuka JP 94100561 1048 ## STR1177## Otsuka JP 94100561 1049 ## STR1178## Otsuka JP 94100561 1050 ## STR1179##
Otsuka JP 94100561 1051 ## STR1180## Otsuka JP 94100561 1052 ## STR1181## Otsuka JP 94100561 1053 ## STR1182## Otsuka JP 94100561 1054 ##
STR1183## Otsuka JP 94100561 1055 ## STR1184## Otsuka JP 94100561 1056 ## STR1185## Otsuka JP 94100561 1057 ## STR1186## Abbott GmbH WO
9500507 1058 ## STR1187## Leo WO 9502577 1059 ## STR1188## Kyorin Kono, Y. et al. 115th Annu Meet Pharmaceut Soc Jpn March 29-31, (Sendai) 1995,
Abst 30 (A3) 10-3. EP 538477 1060 ## STR1189## Abbott GmbH WO 9500507 1061 ## STR1190## Abbott GmbH WO 9500507 1062 ## STR1191## Abbott
GmbH WO 9500507 1063 ## STR1192## Kyowa Hako WO 9509153 1064 ## STR1193## Bayer U. S. Pat. No. 5409932 1065 ## STR1194## Bayer U. S. Pat.
No. 5411960 1066 ## STR1195## Baxter France, C. P. et al. Разработка Лекарственных Средств Res 1995, 35:49. EP 396282 1067 ## STR1196## Bayer U. S.
Pat. No. 5411960 1068 ## STR1197## Bayer U. S. Pat. No. 5411960 1069 ## STR1198## Bayer U. S. Pat. No. 5411960 1070 ## STR1199## Bayer U. S. Pat. No.
5411960 1071 ## STR1200## Bayer U. S. Pat. No. 5409932 1072 ## STR1201## Kyowa Hako WO 9509153 1073 ## STR1202## Kyowa Hako WO 9509153
1074 ## STR1203## Kyowa Hako WO 9509153 1075 ## STR1204## Kyowa Hako WO 9509153 1076 ## STR1205## Kyowa Hako WO 9509153 1077 ##
STR1206## Kyowa Hako WO 9509153 1078 ## STR1207## Kyowa Hako WO 9509153 1079 ## STR1208## Sanofi-Synthe-labo WO 9529672 1080 ##
STR1209## Takeda WO 9535296 1081## STR1210 ## вершина WO 9535308 1082 ## STR1211## Entro pin WO 9534561 1083 ## STR1212## Takeda WO
9535296 1084 ## STR1213## Takeda WO 9535296 1085 ## STR1214## Takeda WO 9535296 1086 ## STR1215## Takeda WO 9535296 1087## STR1216 ##
вершина WO 9535308 1088## STR1217 ## вершина WO 9535308 1089## STR1218 ## вершина WO 9535308 1090 ## STR1219## Sanofi-Synthe-labo WO
9529672

1091 ## STR1220## Sanofi-Synthe-labo WO 9529672 1092 ## STR1221## Sanofi-Synthe-labo WO 9529672 1093 ## STR1222## 3M Pharma-ceuti calcs U. S.
Pat. No. 5482936 1094 ## STR1223## 3M Pharma-ceuti calcs U. S. Pat. No. 5482936 1095 ## STR1224## 3M Pharma-ceuti calcs U. S. Pat. No. 5482936 1096 ##
STR1225## 3M Pharma-ceuti calcs U. S. Pat. No. 5482936 1097 ## STR1226## Entro-pin WO 9534561 1098 ## STR1227## Entro-pin WO 9534561 1099 ##
STR1228## Entro-pin WO 9534561 1100 ## STR1229## Entro-pin WO 9534561 1101 ## STR1230## Entro-pin WO 9534561 1102 ## STR1231## Entro-pin
WO 9534561 1103 ## STR1232## Entro-pin WO 9534561 1104 ## STR1233## Taisho 1) Yoshida, H. et al. Biol Pharm Bull 1997, 20(1): 94. JP 93051358 1105 #
STR1234## Sankyo Shiozaki, M. et al. Тетраэдр Lett 1996 37(40): 7271. 1106 ## STR1235## Nippon Kayaku JP 96283290 1107 ## STR1236## Eisai EP
889032 1108 ## STR1237## AWD. pharma WO 9734874 1109 ## STR1238## AWD. pharma WO 9734874 1110 ## STR1239## AWD. pharma WO 9734874
1111 ##STR1240## Astra Zeneca 1) Saem-strand, B. et al. J Фарм-акол Exp Ther 1999, 228 (3): 1174. EP 0463514 1112 ## STR1241## Eisai Nagai, M. et al. 217-
я встреча ACS Natl (марч 21-25, Ana-heim) 1999, Abst MEDI 050. EP 889032 1113 ## STR1242## башкирский медицинский университет Садыков Р. Ф. и
др. Naunyn-Schmid Arch Pharm-acol 1998, 358(1, Suppl. 2): Abst P 52.28. 1114 ## STR1243## Gruen-enthal EP 856513 1115 ## STR1244## Gruen-enthal EP
856513 1116 ## STR1245## Gruen-enthal EP 856513 1117 ##STR1246## Gruen-enthal EP 856513 1118 ## STR1247## Japan Energy JP 98231297 1119 ##
STR1248## Japan Energy JP 98231297 1120 ## STR1249## Japan Energy JP 98231297 1121 ## STR1250## Japan Energy JP 98231297 1122 ## STR1251##
Japan Energy JP 98231297 1123 ## STR1252## Celgene 1) Moreira, A. L. et al. J Нейроонкол 1999, 43(2): 109. Американский Пэт. No. 5463063 1124 ##
STR1253## Celgene U. S. Pat. No. 5874448 1125 ## STR1254## Celgene U. S. Pat. No. 5874448 1126 ## STR1255## Celgene U. S. Pat. No. 5874448 1127 ##
STR1256## Celgene U. S. Pat. No. 5874448 1128 ## STR1257## Celgene U. S. Pat. No. 5874448 1129 ## STR1258## Eisai EP 889032 1130 ## STR1259##
Merck & Co. WO 9909984 1131 ## STR1260## Merck & Co. WO 9909984 1132 ## STR1261## Merck & Co. WO 9909984 1133 ## STR1262## Merck & Co.
WO 9909984 1134 ## STR1263## Hokur-iku JP 99080156 1135 ## STR1264## Hokur-iku JP 99080156 1136 ## STR1265## Hokur-iku JP 99080156 1137 ##
STR1266## Hokur-iku JP 99080156 1138 ## STR1267## Hokur-iku JP 99080156 1139 ## STR1268## SSP CA 2255337 1140 ## STR1269## SSP CA 2255337
1141 ## STR1270## SSP CA 2255337 1142 ## STR1271## Abbott Madar, D. et al. 222-я встреча ACS Natl (26-30 августа, Чикаго) 2001, Abst MEDI 7. EP
1068187 1143 ## STR1272## Active Biotech WO 9955678 1144 ## STR1273## Amer-sham 1) Gesser, B. et al. Proc Natl Acad Sci USA 1997, 94(26): 14620.
WO 9601318 1145 ## STR1274## Kowa WO 9944995 1146 ## STR1275## Kowa WO 9944995 1147 ## STR1276## Kowa WO 9944995 1148 ## STR1277##
OM Pharma WO 0000462 1149 ## STR1278## OM Pharma WO 0000462 1150 ## STR1279## Ono WO 0003980 1151 ## STR1280## Ono WO 0003980 1152 #
STR1281## Ono WO 0003980 1153 ## STR1282## Ono WO 0003980 1154 ## STR1283## Ono WO 0003980 1155 ## STR1284## Ono WO 0003980 1156 #
STR1285## Ono WO 0003980 1157 ## STR1286## Univer-sity of Bristol WO 0014114 1158 ## STR1287## Eisai Hibi, S. et al. Bioorg Med Chem Lett 2000,
10(7): 623. EP 0889032 1159 ## STR1288## Janssen WO 0021959 1160 ## STR1289## Janssen WO 0021959 1161 ## STR1290## Janssen WO 0021959 1162 #
STR1291## Janssen WO 0021959 1163 ## STR1292## Fuji-sawa WO 0021979 1164 ## STR1293## Abbott 1) Liu, G. et al. 220th ACS Natl Meet (Aug 20-24,
Washington DC) 2000, Abst MEDI 171. 1) СИИА Пат. No. 6110922 1165 ## STR1294## Рак повторный поиск UK WO 0052046 1166 ## STR1295## Рак
повторный поиск UK WO 0052046 1167 ## STR1296## Рак повторный поиск UK WO 0052046 1168 ## STR1297## Южно-эрнский институт повторного
поиска WO 0112197 1169 ## STR1298## Южно-эрнский институт повторного поиска WO 0112197 1170 ## STR1299## Abbott Labs. EP 1068187 1171 ##
STR1300## Abbott EP 1068187 1172 ## STR1301## Abbott EP 1068187 1173 ## STR1302## Fuji-sawa Spears, G. et al. 21st Symp Med Chem (Nov 28-30,
Kyoto) 2001, Abst 2P-29. 1174 ## STR1303## Austin Re-search Institute Tselios, T. et al. J Med Chem 2002, 45(2): 275. 1175 ## STR1304## Eukar-ion WO
0204454 1176 ## STR1305## Nobex 1) Riggs - Sauthier, J. A. et al. 224th ACS Natl Встреча (18-22 августа, Бостон) 2002, Abst MEDI 305. WO 0218324 1177 #
STR1306## Tularik WO 0238107 1178 ## STR1307## Tularik WO 0238107 1179 ## STR1308## Tularik WO 0238107 1180 ## STR1309## Tularik WO
0238107 1181 ## STR1310## Tularik WO 0238107 1182 ## STR1311## Tularik WO 0238107 1183 ## STR1312## Tularik WO 0238107 1184 ## STR1313##
Tularik WO 0238107 1185 ## STR1314## Tularik WO 0238107 1186 ## STR1315## Sanofi-Synthe labo WO 0242269 1187 ## STR1316## Sanofi-Synthe labo
WO 0242269 1188 ## STR1317## Sanofi-Synthe labo WO 0242269 1189 ## STR1318## Sanofi-Synthe labo WO 0242269 1190 ## STR1319## Sanofi-Synthe
labo WO 0242269 1191 ## STR1320## Sanofi-Synthe labo WO 0242269 1192 ## STR1321## Sanofi-Synthe labo WO 0242269 1193 ## STR1322## Sanofi-
Synthe labo WO 0242269 1194 ## STR1323## Sanofi-Synthe labo WO 0242269 1195 ## STR1324## ячейка Thera-peutics WO 0268421 1196 ## STR1325##
ячейка Thera-peutics WO 0268421 1197 ## STR1326## Sumi-tomo Pharma-ceuti calcs EP 248399 1198 ## STR1327## Aventus Pharma EP 248734 1199 ##
STR1328## Sumi-tomo Pharma-ceuti calcs EP 248399 1200 ## STR1329## Sumi-tomo Pharma-ceuti calcs EP 248399 1201 ## STR1330## Sumi-tomo Pharma-
ceuti calcs EP 248399 1202 ## STR1331## Sumi-tomo Pharma-ceuti calcs EP 248399 1203 ## STR1332## Sumi-tomo Pharma-ceuti calcs EP 248399 1204 ##
STR1333## Sumi-tomo Pharma-ceuti calcs EP 248399 1205 ## STR1334## Sumi-tomo Pharma-ceuti calcs EP 248399 1206 ## STR1335## Sumi-tomo Pharma-
ceuti calcs EP 248399 1207 ## STR1336## Aventus Pharma EP 248734 1208 ## STR1337## Aventus Pharma EP 248734 1209 ## STR1338## Aventus Pharma EP
248734

1210 ## STR1339## Aventus Pharma EP 248734 1211 ## STR1340## Aventus Pharma EP 248734 1212 ## STR1341## Aventus Pharma EP 248734 1213 ##
STR1342## Pfizer AU 8783281 Найдено 1214 ##STR1343## портовый филиал. Американский Пат. No. 4755529 1215 ## STR1344## Roche Bio-science AU
8782540 1216 ## STR1345## Roche Bio-science AU 8782540 1217 ## STR1346## Roche Bio-science AU 8782540 1218 ## STR1347## Roche Bio-science AU
8782540 1219 ## STR1348## Novar - tis EP 296110 1220 ## STR1349## Novar-tis 1) Lam, C. et al. Антимикробные Средства Химик 1991, 35(3): 500. AU
8822785 1221 ## STR1350## Scher-ING-Plough EP 318214 1222 ## STR1351## Novar-TIS AU 8822785 1223 ## STR1352## Novar-TIS AU 8822785 1224 #
STR1353## Novar - tis EP 296110 1225 ## STR1354## Novar - tis EP 296110 1226 ## STR1355## Novar - tis EP 296110 1227 ## STR1356## Scher-ING-
Plough EP 318214 1228 ## STR1357## Leo WO 8910351 1229 ## STR1358## Leo WO 8910351 1230 ## STR1359## Leo WO 8910351 1231 ## STR1360##
Leo WO 8910351 1232 ## STR1361## Leo WO 8910351 1233 ## STR1362## Leo WO 8910351 1234 ## STR1363## Leo WO 8910351 1235 ## STR1364##
Tanabe Seiyaku 1) Уэно, М. и др. Jpn J Фармакол 1992, 58 (Suppl. 1): Абсг О-210. AU 8942368 1236 ## STR1365## Green-wich Pharm. AU 9047648 1237 ##
STR1366## Green-wich Pharm. AU 9047648 1238 ## STR1367## Aventus Pharma EP 378456 1239 ## STR1368## Aventus Pharma EP 378456 1240 ##
STR1369## Roche EP 384349 1241 ## STR1370## SPA EP 421074 1242 ## STR1371## Hitachi Chemi - cal EP 421682 1243 ## STR1372## Fuji-sawa 1)
Manda, T. et al. Jpn J Pharmacol 1997, 73 (Suppl. 1): Абсг П-140. EP 421404 1244 ## STR1373## Leo WO 9109841 1245 ## STR1374## Hitachi Chemi - cal
EP 421682 1246 ## STR1375## Hitachi Chemi - cal EP 421682 1247 ## STR1376## Hitachi Chemi - cal EP 421682 1248 ## STR1377## Hitachi Chemi - cal
EP 421682 1249 ## STR1378## Hitachi Chemi - cal EP 421682 1250 ## STR1379## Hitachi Chemi - cal EP 421682 1251 ## STR1380## Hitachi Chemi - cal
EP 421682 1252 ## STR1381## Hitachi Chemi - cal EP 421682 1253 ## STR1382## SPA EP 421074 1254 ## STR1383## SPA EP 421074 1255 ## STR1384##
SPA EP 421074 1256 ## STR1385## SPA EP 421074 1257 ## STR1386## SPA EP 421074 1258 ## STR1387## SPA EP 421074 1259 ## STR1388## SPA
EP 421074 1260 ## STR1389## SPA EP 421074 1261 ## STR1390## SPA EP 421074 1262 ## STR1391## SPA EP 421074 1263 ## STR1392## SPA EP
421074 1264 ## STR1393## SPA EP 421074 1265 ## STR1394## SPA EP 421074 1266 ## STR1395## SPA EP 421074 1267 ## STR1396## SPA EP 421074
1268 ## STR1397## SPA EP 421074 1269 ## STR1398## Leo EP 506794 1270 ## STR1399## Фиджи-sawa WO 9119708 Найдено 1271## STR1400 ##
портовый филиал. Американский Пат. No. 5091368 1272 ## STR1401## Aventus Pharma EP 476658 1273 ## STR1402## Merck & Co. EP 480713 1274 ##

STR1403## Aventis Pharma EP 476658 1275 ## STR1404## Aventis Pharma EP 476658 1276 ## STR1405## Aventis Pharma EP 476658 1277 ## STR1406## Aventis Pharma EP 476658 1278 ## STR1407## Aventis Pharma EP 476658 1279 ## STR1408## Aventis Pharma EP 476658 1280 ## STR1409## Aventis Pharma EP 476658 1281 ## STR1410## Aventis Pharma EP 476658 Найден 1282## STR1411 ## портовый филиал. Американский Пэт. No. 5091368 1283 ## STR1412## Merck & Co. EP 480713 1284 ## STR1413## Merck & Co. EP 480713 1285 ## STR1414## Merck & Co. EP 480713 1286 ## STR1415## Merck & Co. EP 480713 1287 ## STR1416## Kyowa Hakko Miwa, K. et al. 113-я ежегодная встреча Pharmaceut Soc Jpn (29-31 марта, Осака) 1993, Abst 30CC 13-1. EP 505058 1288 ## STR1417## Fuji-sawa Nakamura, K. et al. Chem Pharm Bull 1993, 41(5): 894. AU 8783152 1289 ## STR1418## Wyeth U. S. Pat. No. 5312831 1290 ## STR1419## Wyeth U. S. Pat. No. 5312831 1291 ## STR1420## Wyeth U. S. Pat. No. 5312831 1292 ## STR1421## клетка Thera-peutics WO 9416704 1293 ## STR1422## Immu-nex 1) Пресс-релиз корпорации Immunex 1994, 21 июля. WO 9506031 1294 ## STR1423## клетка Thera-peutics WO 9416704 1295 ## STR1424## клетка Thera-peutics WO 9416704 1296 ## STR1425## клетка Thera-peutics WO 9416704 1297 ## STR1426## клетка Thera-peutics WO 9416704 1298 ## STR1427## клетка Thera-peutics WO 9416704 1299 ## STR1428## клетка Thera-peutics WO 9416704 1300 ## STR1429## клетка Thera-peutics WO 9416704 1301 ##STR1430## Abbott GmbH WO 9500493 1302 ## STR1431## Glaxo-Smith Kline WO 9504734 1303 ## STR1432## Abbott GmbH WO 9500493 1304 ##STR1433## Abbott GmbH WO 9500493 1305 ##STR1434## Abbott GmbH WO 9500493 1306 ##STR1435## Abbott GmbH WO 9500493 1307 ## STR1436## Abbott GmbH WO 9500493 1308 ## STR1437## Abbott GmbH WO 9500493 1309 ## STR1438## Abbott GmbH WO 9500493 1310 ##STR1439## Abbott GmbH WO 9500493 1311 ## STR1440## Abbott GmbH WO 9500493 1312 ##STR1441## Abbott GmbH WO 9500493 1313 ## STR1442## Abbott GmbH WO 9500493 1314 ## STR1443## Sanofi-Synthe-labo EP 644197 1315 ## STR1444## Sanofi-Synthe-labo CA 2125021 1316 ## STR1445## Glaxo Smith Kline WO 9504734 1317 ## STR1446## Glaxo Smith Kline WO 9504734 1318 ## STR1447## Glaxo Smith Kline WO 9504734 1319 ## STR1448## Glaxo Smith Kline WO 9504734 1320 ## STR1449## Glaxo Smith Kline WO 9504734 1321 ## STR1450## Glaxo Smith Kline WO 9504734 1322 ## STR1451## Japan Tobac-co JP 95002779 1323 ## STR1452## Pharma-cia 1) Gozzi, P. et al. J Фармакол Exp Ther 1999, 291(1): 199. JP 1995501330 1324 ## STR1453## Sanofi-Synthe-labo EP 644197 1325 ## STR1454## Sanofi-Synthe-labo EP 644197 1326 ## STR1455## Sanofi-Synthe-labo EP 644197 1327 ## STR1456## Sanofi-Synthe-labo CA 212021 1328 ## STR1457## Sanofi-Synthe-labo CA 212021 1329 ## STR1458## Sanofi-Synthe-labo CA 212021 1330 ## STR1459## Sanofi-Synthe-labo CA 212021 1331 ## STR1460## Sanofi-Synthe-labo CA 212021

1332 ## STR1461## Sanofi-Synthe-labo CA 212021 1333 ## STR1462## Sanofi-Synthe-labo CA 212021 1334 ## STR1463## Lilly WO 9517382 1335 ## STR1464## Millen-nium WO 9518610 1336 ## STR1465## Aventis Pharma WO 9520578 1337 ## STR1466## клетка Thera-peutics WO 9522546 1338 ## STR1467## Lilly WO 9517382 1339 ## STR1468## Lilly WO 9517382 1340 ## STR1469## Lilly WO 9517382 1341 ## STR1470## Lilly WO 9517382 1342 ## STR1471## Lilly WO 9517382 1343 ## STR1472## Lilly WO 9517382 1344 ## STR1473## Lilly WO 9517382 1345 ## STR1474## Lilly WO 9517382 1346 ## STR1475## Lilly WO 9517382 1347 ## STR1476## Lilly WO 9517382 1348 ## STR1477## Cyto Med WO 9518610 1349 ## STR1478## Cyto Med WO 9518610 1350 ## STR1479## Cyto Med WO 9518610 1351 ## STR1480## Cyto Med WO 9518610 1352 ## STR1481## Cyto Med WO 9518610 1353 ## STR1482## Cyto Med WO 9518610 1354 ## STR1483## Cyto Med WO 9518610 1355 ## STR1484## Cyto Med WO 9518610 1356 ## STR1485## Cyto Med WO 9518610 1357 ## STR1486## Cyto Med WO 9518610 1358 ## STR1487## Cyto Med WO 9518610 1359 ## STR1488## Cyto Med WO 9518610 1360 ## STR1489## Cyto Med WO 9518610 1361 ## STR1490## Cyto Med WO 9518610 1362 ## STR1491## Cyto Med WO 9518610 1363 ## STR1492## Cyto Med WO 9518610 1364 ## STR1493## Cyto Med WO 9518610 1365 ## STR1494## Cyto Med WO 9518610 1366 ## STR1495## Duphar EP 664287 1367 ## STR1496## Japan Tobac-co JP 95002779 1368 ## STR1497## Japan Tobac-co JP 95002779 1369 ## STR1498## Japan Tobac-co JP 95002779 1370 ## STR1499## Japan Tobac-co JP 95002779 1371 ## STR1500## Japan Tobac-co JP 95002779 1372 ## STR1501## Japan Tobac-co JP 95002779 1373 ## STR1502## Japan Tobac-co JP 95002779 1374 ## STR1503## Japan Tobac-co JP 95002779 1375 ## STR1504## Aventis Pharma WO 9520578 1376 ## STR1505## Aventis Pharma WO 9520578 1377 ## STR1506## Aventis Pharma WO 9520578 1378 ## STR1507## Aventis Pharma WO 9520578 1379 ## STR1508## Sanofi-Synthe-labo WO 9526958 1380 ## STR1509## клетка Thera-peutics WO 9522546 1381 ## STR1510## клетка Thera-peutics WO 9522546 1382 ## STR1511## ячейка Thera-peutics WO 9522546 1383 ## STR1512## клетка Thera-peutics WO 9522546 1384 ## STR1513## клетка Thera-peutics WO 9522546 1385 ## STR1514## клетка Thera-peutics WO 9522546 1386 ## STR1515## Duphar EP 664287 1387 ## STR1516## Duphar EP 664287 1388 ## STR1517## Duphar EP 664287 1389 ## STR1518## Duphar EP 664287 1390 ## STR1519## Duphar EP 664287 1391 ## STR1520## Duphar EP 664287 1392 ## STR1521## Sanofi-Synthe-labo WO 9526958 1393 ## STR1522## Sanofi-Synthe-labo WO 9526958 1394 ## STR1523## Daikin EP 711766 1395 ## STR1524## Sanofi-Synthe-labo WO 9533751 1396 ## STR1525## Ajino-moto U. S. Pat. No. 5464918 1397 ## STR1526## Ajino-moto U. S. Pat. No. 5464918 1398 ## STR1527## Ajino-moto U. S. Pat. No. 5464918 1399 ## STR1528## Ajino-moto U. S. Pat. No. 5464918 1400 ## STR1529## Sanofi-Synthe-labo WO 9533751 1401 ## STR1530## Sanofi-Synthe-labo WO 9533751 1402 ## STR1531## Sanofi-Synthe-labo WO 9533751 1403 ## STR1532## Sanofi-Synthe-labo WO 9533751 1404 ## STR1533## Sanofi-Synthe-labo WO 9533751 1405 ## STR1534## Sanofi-Synthe-labo WO 9533751 1406 ## STR1535## Daikin EP 711766 1407 ## STR1536## Daikin EP 711766 1408 ## STR1537## Daikin EP 711766 1409 ## STR1538## Daikin EP 711766 1410 ## STR1539## Micro-bial Chem-istry Re-search Foundationjp 96176157 1411 ## STR1540## Tanabe WO 9640641 1412 ## STR1541## Tanabe WO 9640641 1413 ## STR1542## Daiichi Pharma-ceutical 1) Кавагоэ, К. и др. AFMC Int Med Chem Symp (Sept 3-8, Токуо) 1995, Abst P13M183. JP 97059236 1414 ## STR1543## вершина WO 9722618 1415 ## STR1544## вершина WO 9722618 1416 ## STR1545## вершина WO 9722618 1417 ## STR1546## вершина WO 9722618 1418 ## STR1547## вершина WO 9722618 1419 ## STR1548## вершина WO 9722618 1420 ## STR1549## Astra Zeneca WO 9731023 1421 ## STR1550## Университет Пенсильвании-sylvania WO 9733603 1422 ## STR1551## Astra Zeneca WO 9731023 1423 ## STR1552## Astra Zeneca WO 9731023 1424 ## STR1553## Astra Zeneca WO 9731023 1425 ## STR1554## Astra Zeneca WO 9731023 1426 ## STR1555## Leo WO 9737972 1427 ## STR1556## Taisho JP 97194476 1428 ## STR1557## Leo WO 9737972 1429 ## STR1558## Leo WO 9737972 1430 ## STR1559## Leo WO 9737972 1431 ## STR1560## Leo WO 9737972 1432 ## STR1561## Leo WO 9737972 1433 ## STR1562## Glaxo-Smith Kline WO 9743250 1434 ## STR1563## Pharm-acia WO 9745409 1435 ## STR1564## Pharm-acia WO 9745409 1436 ## STR1565## Pharm-acia WO 9745409 1437 ## STR1566## Pharm-acia WO 9745409 1438 ## STR1567## LEK EP 477912 1439 ## STR1568## Astra Zeneca WO 9828275 1440 ## STR1569## Astra Zeneca WO 9828275 1441 ## STR1570## Astra Zeneca WO 9828270 1442 ## STR1571## Astra Zeneca WO 9828270 1443 ## STR1572## Astra Zeneca WO 9828270 1444 ## STR1573## Astra Zeneca WO 9828270 1445 ## STR1574## Astra Zeneca WO 9828270 1446 ## STR1575## Astra Zeneca WO 9828270 1447 ## STR1576## Astra Zeneca WO 9828270 1448 ## STR1577## Astra Zeneca WO 9828270 1449 ## STR1578## Astra Zeneca WO 9828270 1450 ## STR1579## Astra Zeneca WO 9828270 1451 ## STR1580## Astra Zeneca WO 9828270 1452 ## STR1581## Astra Zeneca WO 9828270 1453 ## STR1582## Astra Zeneca WO 9828270 1454 ## STR1583## Astra Zeneca WO 9828270 1455 ## STR1584## Astra Zeneca WO 9828270

1456 ## STR1585## Astra Zeneca WO 9828270 1457 ## STR1586## Astra Zeneca WO 9828270 1458 ## STR1587## Astra Zeneca WO 9828270 1459 ## STR1588## Daiichi Pharma-ceutical Koiva, T. et al. J Антибиотик 1999, 52(2): 198. 1460 ## STR1589## Bristol-Myers Squibb WO 0244181 1461 ## STR1590## Bristol-Myers Squibb WO 0244181 1462 ## STR1591## Bristol-Myers Squibb WO 0244181 1463 ## STR1592## Bristol-Myers Squibb WO 0244181 1464 ## STR1593## Bristol-Myers Squibb WO 0244181 1465 ## STR1594## Bristol-Myers Squibb WO 0244181 1466 ## STR1595## Bristol-Myers Squibb WO 0244181 1467 ## STR1596## Bristol-Myers Squibb WO 0244181 1468 ## STR1597## Bristol-Myers Squibb WO 0244181 1469 ## STR1598## Gruen-enthal WO 0290317

[1698]

Последовательность CWU 0 SQTВ ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ Патентная заявка содержит длинный раздел "перечисление последовательностей". Один копия "перечня последовательностей" доступна в электронном виде с сайта: Веб-сайт USPTO (<http://seqdata.uspto.gov/?pageRequest=docDetail&DocID=US20060257852A1>). Электронная копия "перечня последовательностей" также будет доступна на веб-сайте USPTO по запросу и уплате пошлины, установленной в 37 CFR 1.19 (b) (3).

0 SQTВ ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ Патентная заявка содержит длинный раздел "перечисление последовательностей". Один копия "перечня последовательностей" доступна в электронном виде с сайта: Веб-сайт USPTO (<http://seqdata.uspto.gov/?pageRequest=docDetail&DocID=US20060257852A1>). Электронная копия "перечня последовательностей" также будет доступна на веб-сайте USPTO по запросу и уплате пошлины, установленной в 37 CFR 1.19 (b) (3).

Images

Add to Shopping Cart

View Shopping Cart

Hit List

Top

