



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2019.11.28

(21) Номер заявки
201390670

(22) Дата подачи заявки
2011.11.10

(51) Int. Cl. **C07K 14/44** (2006.01)
A61K 39/008 (2006.01)
G01N 33/569 (2006.01)

(54) МОЛЕКУЛА НУКЛЕИНОВОЙ КИСЛОТЫ, СЛУЖАЩАЯ АДЬЮВАНТОМ ДЛЯ СВЯЗАННОГО ПОЛИНУКЛЕОТИДА, КОДИРУЮЩЕГО АНТИГЕН

(31) **10190705.3; 61/412,034**

(32) **2010.11.10**

(33) **EP; US**

(43) **2013.10.30**

(86) **PCT/EP2011/069849**

(87) **WO 2012/062861 2012.05.18**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ЛАБОРАТОРИОС ЛЕТИ, С.Л. (ES)

(72) Изобретатель:
**Алонсо-Бедате Карлос, Сото-Альварес
Мануэль, Пароди-Де Ла Фуенте
Нуриа, Пико Де Соанья-Суарес Яго
(ES)**

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) US-A1-2005287176
US-A1-2003138451
SOTO MANUEL ET AL.: "Multicomponent chimeric antigen for serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis", JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, WASHINGTON, DC, US, vol. 36, no. 1, 1 January 1998 (1998-01-01), pages 58-63, XP002617824, ISSN: 0095-1137 cited in the application see whole document and in particular Fig.2.

PASSOS S. ET AL.: "Recombinant Leishmania antigens for serodiagnosis of visceral leishmaniasis", CLINICAL AND DIAGNOSTIC LABORATORY IMMUNOLOGY, vol. 12, no. 10, October 2005 (2005-10), pages 1164-1167, XP002631357, ISSN: 1071-412X see whole document and in particular last paragraph of page 1164 and last sentence of page 1165

DE CARVALHO LUCAS PEDREIRA ET AL.: "Characterization of the immune response to Leishmania infantum recombinant antigens", MICROBES AND

INFECTION, vol. 5, no. 1, January 2003 (2003-01), pages 7-12, XP002631358, ISSN: 1286-4579 see whole document and in particular the abstract and last paragraph of the article.

REQUENA J.M. ET AL.: "Immune and clinical parameters associated with Leishmania infantum infection in the golden hamster model", VETERINARY IMMUNOLOGY AND IMMUNOPATHOLOGY, ELSEVIER BV, AMSTERDAM, NL, vol. 76, no. 3, 4, 31 October 2000 (2000-10-31), pages 269-281, XP002284059, ISSN: 0165-2427, DOI:DOI:10.1016/S0165-2427(00)00221-X see whole document and in particular paragraph bridging page 277 and page 278.

VIRGINIA INIESTA ET AL.: "Leishmania major infection in susceptible and resistant mice elicit a differential humoral response against a total soluble fraction and defined recombinant antigens of the parasite", PARASITOLOGY RESEARCH; FOUNDED AS ZEITSCHRIFT FUR PARASITENKUNDE, SPRINGER, BERLIN, DE, vol. 102, no. 5, 10 January 2008 (2008-01-10), pages 887-893, XP019590512, ISSN: 1432-1955 the whole document

CARCELEN J. ET AL.: "The Chimerical Multi-Component Q protein from Leishmania in the absence of adjuvant protects dogs against an experimental Leishmania infantum infection", VACCINE, ELSEVIER LTD, GB, vol. 27, no. 43, 9 October 2009 (2009-10-09), pages 5964-5973, XP026643893, ISSN: 0264-410X, DOI:10.1016/J.VACCINE.2009.07.069 [retrieved on 2009-08-08] the whole document

PICO DE COANA Y. ET AL.: "Molecular cloning and characterization of Cup a 4, a new allergen from Cupressus arizonica", BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, ACADEMIC PRESS INC. ORLANDO, FL, US, vol. 401, no. 3, 22 October 2010 (2010-10-22), pages 451-457, XP027429646, ISSN: 0006-291X [retrieved on 2010-09-24] the whole document

MCKIERNAN EADAOIN ET AL.: "The role of S100 genes in breast cancer progression", TUMOR BIOLOGY, vol. 32, no. 3, June 2011 (2011-06), pages 441-450 URL, XP002665777, ISSN: 1010-4283(print) the whole document

(57) Изобретение относится к молекуле нуклеиновой кислоты, которая кодирует иммуногенный полипептид APP, состоящий из Lip2b, Lip2a и LiPO-Ct, и которая связана с нуклеотидной последовательностью, кодирующей антиген, для которого молекула нуклеиновой кислоты служит адьювантом. Также изобретение относится к иммуногенному полипептиду, кодируемому заявленной молекулой нуклеиновой кислоты; конструкции нуклеиновой кислоты, содержащей заявленную молекулу нуклеиновой кислоты; иммуногенной композиции, содержащей заявленную

молекулу нуклеиновой кислоты; и к их применениям для лечения заболевания, ассоциированного с указанным антигеном.

033816 B1

033816 B1

Область техники, к которой относится изобретение

Изобретение относится к новому адьюванту и к его применению в качестве вакцины в комбинации с антигеном.

Уровень техники

Адьюванты определяют как вещества, роль которых заключается в усилении или направлении антигенспецифических иммунных ответов при использовании в сочетании со специфическими антигенами (Wack A. et al., (2005) *Curr. Opin. Immunol.* 17, 411-418). Как правило, объединенные с антигенами адьюванты, как в случае со всеми доступными в настоящее время коммерческими вакцинами, не индуцируют иммунные ответы против самих себя. Вследствие слабых иммуногенных свойств большинства антигенов адьюванты используют для усиления, активации и направления врожденного и приобретенного иммунных ответов к этим антигенам. Понятие адьювантов распространяется на носители, которые взаимодействуют с поверхностными молекулами на специфических клетках иммунной системы, которые действуют в области контакта иммунной системы хозяина и вводимого антигена (Segal B.H. et al., *Drug Discov. Today*, 2006 Jun, 11(11-12):534-40). При этом адьюванты помогают стимулировать иммунную систему и увеличивают ответ на совместно вводимый антиген. Таким образом, адьюванты широко используют при получении вакцин.

Адьюванты можно классифицировать в соответствии с их физико-химическими свойствами или механизмами действия. Два основных класса адьювантов включают соединения, которые непосредственно воздействуют на иммунную систему, такие как бактериальные токсины, которые стимулируют иммунные ответы, и молекулы, способствующие презентации антигенов управляемым способом и проявляющие себя как носитель. В настоящее время для увеличения иммунологических свойств антигенов используют большое число адьювантов, включая масла, соли алюминия, белки и нуклеиновую кислоту (Steven G. Reed et al., (2003) *Expert Rev. Vaccines* 2, 167-188).

В основном вследствие того, что ответ против антигена и качество иммунного ответа в значительной степени зависят от чистоты и природы адьюванта. Идеальный адьювант должен быть химически и физически хорошо определен таким образом, чтобы облегчать контроль качества. Ввиду того, что в большинстве случаев антигены хорошо определены, контроль специфичности адьюванта обеспечивает воспроизводимое развитие конечного антигенспецифического иммунного ответа. В этом контексте адьюванты могут не только вызывать иммунный ответ против антигена, а также направлять иммунный ответ, который антиген вызывает у хозяина. Если иммунный ответ развивается в соответствующем направлении, то, по существу, природа адьюванта будет влиять на значимость антигена в качестве терапевтического продукта. В дополнение к облегчению индукции иммунного ответа (гуморального или клеточного) против антигенов целью адьювантов является активация иммунных эффекторов, которые приводят к продукции специфических цитокинов. Кроме того, вследствие того, что специфичность и величина иммунных ответов, индуцируемых конструкцией антиген-адьювант, в значительной степени зависят от природы иммунных клеток хозяина, эффективность адьювантов невозможно анализировать независимо от хозяина. Таким образом, индуцируемые антигеном иммунные ответы могут изменяться в зависимости от природы адьюванта и природы иммунной системы хозяина.

Сохраняется необходимость в новых адьювантах, поскольку разрабатывают новые вакцины, и для получения эффективной индукции иммунного ответа всегда необходимы адьюванты. Новые адьюванты могут также придавать вакцинам новые привлекательные свойства. Например, они могут влиять на тип и направление вызываемого иммунного ответа.

Описание изобретения

Неожиданно авторы изобретения показали, что генетическое слияние конкретных белковых фрагментов, происходящих из видов *Leishmania*, с определенным антигеном способно значительно увеличить иммунный потенциал слитого антигена при введении получаемого химерного белка *in vivo* мышам. Авторы также демонстрируют, что белок, получаемый при экспрессии *in vivo* химерного гена, содержащегося в плазмидной ДНК, также индуцирует высокий гуморальный ответ против генетически слитого антигена, тогда как введение плазмиды, содержащей ген, кодирующий один антиген, не индуцирует.

Молекула нуклеиновой кислоты.

В первом аспекте изобретение относится к молекуле нуклеиновой кислоты, выбранной из:

i) нуклеиновых кислот, кодирующих иммуногенный полипептид AAP, состоящий из Lip2b, Lip2a и LiPO-St и имеющий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 50% идентична последовательности SEQ ID NO: 1 по всей ее длине,

ii) нуклеиновых кислот, содержащих нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 50% идентична последовательности SEQ ID NO: 2 по всей ее длине,

причем молекула нуклеиновой кислоты не содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, по меньшей мере на 85% идентичный последовательности SEQ ID NO: 3 по всей ее длине,

причем молекула нуклеиновой кислоты функционально связана с нуклеотидной последовательностью, кодирующей антиген, для которого молекула нуклеиновой кислоты служит адьювантом.

Указанная молекула нуклеиновой кислоты предпочтительно предназначена для применения в каче-

стве адьюванта, когда указанная молекула нуклеиновой кислоты функционально связана с нуклеотидной последовательностью, кодирующей антиген, как далее определено в рамках изобретения.

Описанная в настоящем изобретении молекула нуклеиновой кислоты представляет интерес вследствие того, что кодируемый белок можно использовать в качестве адьюванта. Адьювант в настоящем описании определяют как молекулу, которая способна представить антиген иммунной системе таким образом, что развивается иммунный ответ или его увеличение против указанного антигена при введении антигена в комбинации с адьювантом. Для анализа антигенспецифического вызванного иммунного ответа указанный иммунный ответ сравнивают с иммунным ответом, индуцированным в присутствии антигена без адьюванта. Индукцию оценивают у индивидуума или в клетках, полученных у индивидуума.

В этом контексте антигенспецифический вызванный иммунный ответ является синонимом индуцированного иммунного ответа против указанного антигена или увеличения индукции иммунного ответа против указанного антигена или детектируемого иммунного ответа против указанного антигена. Вызывание антигенспецифического иммунного ответа можно заменять индукцией, усилением или увеличением иммунного ответа против антигена.

Иммунный ответ может представлять собой В- и/или Т-клеточный ответ. Иммунный ответ может представлять собой В-клеточный ответ, т.е. продукцию антитела, специфически направленного против указанного антигена. Антитело предпочтительно представляет собой антитело IgG, более предпочтительно антитело IgG2a и/или IgG1. Иммунный ответ может представлять собой Т-клеточный ответ, предпочтительно Th₁-ответ, Th₂-ответ или сбалансированный Th₂/Th₁-ответ.

Специалисту известно, что в зависимости от заболевания может быть необходима индукция В- и/или Т-клеточного ответа для подавления заболевания. Продукцию указанного антитела можно оценивать ELISA, предпочтительно как проводят в примерах. Альтернативно, указанный иммунный ответ можно детектировать, определяя продукцию цитокинов, таких как, например, IFN- γ , IL-6, TNF- α или IL-10. Продукцию таких цитокинов можно оценивать ELISA, предпочтительно как проводят в примерах.

В предпочтительном варианте осуществления детекция антигенспецифического вызванного иммунного ответа означает, что указанную детекцию проводят по меньшей мере после одного, двух, трех, четырех, пяти, шести, семи, восьми, девяти, десяти, одиннадцати, двенадцати часов или более или по меньшей мере одних суток после введения указанных адьюванта и антигена, или по меньшей мере двух суток, или по меньшей мере трех суток, или по меньшей мере четырех суток, или более. Детекцию проводят у индивидуума или в клетках, полученных у индивидуума, предпочтительно как проводят в примерах.

В контексте изобретения антигенспецифический вызванный иммунный ответ предпочтительно означает детектируемый иммунный ответ против указанного антигена. Детектируемое увеличение предпочтительно представляет собой увеличение по меньшей мере на 5% количества антитела и/или цитокина, как уже определено в настоящем описании, или на 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 150, 200% или более по меньшей мере после одного, двух, трех, четырех, пяти, шести, семи, восьми, девяти, десяти, одиннадцати, двенадцати часов или более или по меньшей мере одних суток после введения указанных адьюванта и антигена, или по меньшей мере двух суток, или по меньшей мере трех суток, или по меньшей мере четырех суток, или более. Детекцию проводят у индивидуума или в клетках, полученных у индивидуума, предпочтительно как проводят в примерах.

Предпочтительно указанные аминокислотную последовательность и/или нуклеотидную последовательность, обладающих по меньшей мере 50, 60, 70, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичностью или сходством с конкретной определенной аминокислотной и/или нуклеотидной последовательностью, как определено ранее в рамках изобретения (SEQ ID NO: 1 соответственно SEQ ID NO: 2), считают функциональными, когда кодируемый полипептид относится к адьюванту. Указанный полипептид, представленный указанной аминокислотной последовательностью, способен вызывать, усиливать или увеличивать иммунный ответ против антигена, по меньшей мере, до некоторой степени при использовании с указанным антигеном. До "по меньшей мере некоторой степени" предпочтительно означает, что по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90 или 100% антигенспецифического иммунного ответа, детектируемого с использованием SEQ ID NO: 1. Вызывание, индукция, усиление или увеличение иммунного ответа против антигена определены ранее в рамках изобретения.

Молекула нуклеиновой кислоты, как определено в рамках изобретения, предпочтительно представляет собой молекулу, содержащую по меньшей мере 3, 4, 5, 6, 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, 41, 42 или более смежных нуклеотидов SEQ ID NO: 2, и в которой кодируемый полипептид способен вызывать, индуцировать, усиливать или увеличивать иммунный ответ против антигена при использовании с антигеном, как ранее определено в рамках изобретения. В предпочтительном варианте осуществления указанная молекула нуклеиновой кислоты, как определено в рамках изобретения, предпочтительно представляет собой молекулу, содержащую по меньшей мере 762, 765, 770, 780, 790, 800, 810, 820, 830, 840 850, 860, 870, 880, 890, 900, 910, 920, 930, 940, 950, 960, 970, 980, 990, 1000 или 1110 смежных нуклеотидов SEQ ID NO: 2. В предпочтительном варианте осуществления указанная молекула нуклеиновой кислоты, как определено в рам-

ках изобретения, предпочтительно представляет собой молекулу, содержащую не более 1110, 1000, 990, 980, 970, 960, 950, 940, 930, 920, 910, 900, 890, 880, 870, 860, 850, 840, 830, 820, 810, 800, 790, 780, 770 или 765 смежных нуклеотидов SEQ ID NO: 2.

Полипептид, как определено в рамках изобретения, предпочтительно представляет собой полипептид, содержащий по меньшей мере 6, 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, 41, 42 или более смежных аминокислот SEQ ID NO: 1 и который способен вызывать, индуцировать, усиливать или увеличивать иммунный ответ против антигена при использовании с антигеном, как ранее определено в рамках изобретения. В предпочтительном варианте осуществления указанная молекула нуклеиновой кислоты, как определено в рамках изобретения, предпочтительно представляет собой молекулу, содержащую по меньшей мере 254, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360 или 370 смежных аминокислот SEQ ID NO: 1. В предпочтительном варианте осуществления указанная молекула нуклеиновой кислоты, как определено в рамках изобретения, предпочтительно представляет собой молекулу, содержащую не более 370, 360, 350, 340, 330, 320, 310, 300, 290, 280, 270, 260 или 254 смежных аминокислот SEQ ID NO: 1. Состоящий из SEQ ID NO: 1 полипептид также называют ААР (белок-стимулятор или белок-активатор).

Аминокислотную или нуклеотидную последовательность, включенную в настоящее изобретение, можно получать из одной из последовательностей, как определено в рамках изобретения, замещением, вставкой, делецией или добавлением одного, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более нуклеотидов или аминокислот соответственно. Аминокислотную последовательность, включенную в настоящее изобретение, можно получать из одной из последовательностей, как определено в рамках изобретения, добавлением дополнительных N- или C-концевых аминокислот или химических составных групп для увеличения стабильности, растворимости и иммуногенности. В одном из вариантов осуществления аминокислотную последовательность, включенную в настоящее изобретение, получают из SEQ ID NO: 1 консервативным замещением по меньшей мере одной аминокислоты, содержащейся в SEQ ID NO: 1. Указанная аминокислота, которую можно замещать, может представлять собой гистидин. Специалисту известно, что гистидин можно замещать аспарагином или глутамином (т.е. консервативное замещение, как далее определено в рамках изобретения). Таким образом, в одном из вариантов осуществления включенную в изобретение аминокислотную последовательность получают из SEQ ID NO: 1, и она содержит не более 1, 2, 3, 4, 5, или 6 гистидинов. Таким образом, в одном из вариантов осуществления включенную в изобретение аминокислотную последовательность получают из SEQ ID NO: 2, и она кодирует аминокислотную последовательность, которая содержит не более 1, 2, 3, 4, 5, или 6 гистидинов. В одном из вариантов осуществления указанная аминокислотная последовательность не содержит какого-либо гистидина, и/или указанная соответствующая последовательность нуклеиновой кислоты кодирует аминокислотную последовательность, которая не содержит гистидин.

В предпочтительном варианте осуществления указанная молекула нуклеиновой кислоты по изобретению не содержит или не состоит из последовательности, кодирующей полипептид, идентичный или по меньшей мере представляющий собой 99, 98, 97, 96, 95, 94, 93, 92, 91, 90, 89, 88, 87, 86, 85% SEQ ID NO: 3 по всей ее длине.

Антиген определен в настоящем описании как молекула, которую может распознавать антитело, индуцированное против указанного антигена, когда указанная молекула содержится у индивидуума. Антиген, который способен индуцировать специфический иммунный ответ у индивидуума, когда указанный антиген содержится у указанного индивидуума, считают иммуногенным или иммуногеном. Иммунный ответ предпочтительно представляет собой такой, как определено ранее в рамках изобретения. Антиген предпочтительно представляет собой полипептид или пептид. Пептид может содержать 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 аминокислот или более. Антиген может представлять собой фрагмент белка или непротессированный белок, происходящий из организма, как определено далее в рамках изобретения. Также возможно использовать несколько антигенов от одного и того же организма для того, чтобы обеспечить более высокую эффективность при борьбе с организмом. Антиген также можно определять по отношению к кодирующей молекуле нуклеиновой кислоты, представленной последовательностью нуклеиновой кислоты.

Источник антигена может представлять собой белок, гидролизат белка и/или его фрагмент, который может находиться в очищенной форме или может содержаться в неочищенной композиции, предпочтительно биологического происхождения, такого как разрушенный ультразвуком или фиксированный бактериальный лизат, лизат паразитических организмов, лизат дрожжей, вирусный лизат, лизат грибов. Альтернативно, антиген может быть химически синтезированным или полученным ферментативно *in vitro*. Источник белка или его фрагмента в качестве антигена также может представлять собой нуклеиновую кислоту, кодирующую указанный белок или его фрагмент, из матрицы РНК или ДНК. Молекулы РНК или ДНК могут представлять собой "голую" ДНК, предпочтительно содержащуюся в везикулах или липосомах, или они могут содержаться в конструкции нуклеиновой кислоты или векторе. Вектор может представлять собой любой известный в данной области (рекомбинантный) ДНК- или РНК-вектор, и предпочтительно представляет собой плазмиду, где гены, кодирующие латентные антигены, функционально связаны с регуляторными последовательностями, обеспечивающими экспрессию и трансляцию

кодируемых мессенджеров. Вектор также может представлять собой ДНК- или РНК-вирус, такой как, но, не ограничиваясь им, аденовирус, аденоассоциированный вирус (AAV), ретровирус, лентивирус, модифицированный вирус вакцины анкара (MVA), или вирус оспы птиц, или любой другой вирусный вектор, обеспечивающий экспрессию полипептида у выбранного индивидуума. ДНК-векторы могут представлять собой не интегрирующиеся, такие как эписомально реплицирующиеся векторы, или векторы, интегрирующиеся в геном хозяина посредством случайной интеграции или гомологичной рекомбинации.

Молекулы ДНК, содержащие гены, кодирующие антигенный белок или его фрагменты по настоящему изобретению, необязательно встроенные в вектор, такой как вирус или плаزمид, можно интегрировать в геном индивидуума. В предпочтительном варианте осуществления изобретения такой хозяин может представлять собой микроорганизм. Предпочтительно такой рекомбинантный микроорганизм представляет собой *Mycobacterium*, например, вида *M. tuberculosis*, *M. smegmatis* или *M. bovis*, и, наиболее предпочтительно, бациллу Кальметта-Герена (BCG) *M. bovis* или *M. smegmatis*, способную доставлять хозяину полипептиды или их фрагменты по изобретению (как описано у Yue Y. et al., (2007), *J. Virol. Meth.*, 141:41-48, Sayabiyab Y. et al., (2006), *J. Virol.*, 80:1645-1652). Рекомбинантная BCG и способы рекомбинации известны в данной области, например, в WO 2004094469. Такой рекомбинантный микроорганизм можно формулировать в виде живой рекомбинантной и/или живой аттенуированной вакцины, как показано Jacobs et al., 1987, *Nature*, 327(6122):532-5. Вектор также можно вводить в хозяина бактериального происхождения, такого как, но, не ограничиваясь ими, живые аттенуированные и/или рекомбинантные бактерии шингеллы или сальмонеллы.

В контексте изобретения индивидуум означает человека или животное. Животное, входящее в объем изобретения, включает млекопитающее, предпочтительно собаку.

Антиген может происходить из любого организма, для которого известно, что он ассоциирован с заболеванием или состоянием у индивидуума. Антиген может происходить из микроорганизма, такого как бактерия, дрожжи, грибок, паразитический организм. Альтернативно, антиген может происходить из вируса. Антиген также может являться аутологическим или аутоантигеном, например, такой как ассоциированный или связанный с раком или опухолью антиген. Антигены также могут быть ассоциированы или связаны с аллергическими заболеваниями.

Заболевание может представлять собой паразитарное заболевание. В этом случае антиген может происходить из простейшего, принадлежащего к апикомплексам (таким как плазмодии) и/или типу кинетопластид, и, в частности, членов семейства трипаносоматид, более конкретно различных видов простейших трипаносомид *Leishmania*. Существует более 20 известных видов *Leishmania*, включая виды подрода *Leishmania*, включающего комплекс *L. major*, в том числе *L. major*, комплекс *L. Donovanii*, в том числе *L. chagasi*, *L. donovani* и *L. infantum*, комплекс *L. Mexicana*, в том числе *L. amazonensis* и *L. mexicana*, а также подвиды *Viannia*, включающие комплекс *L. braziliensis*, в том числе *L. braziliensis* и *L. peruviana*, и комплекс *L. guyanensis*, в том числе *L. guyanensis* и *L. panamensis*. В предпочтительном варианте осуществления антиген происходит из видов *Leishmania*, предпочтительно *Leishmania major* и/или *Leishmania infantum*. В другом предпочтительном варианте осуществления антиген происходит из видов *Plasmodium*. Представляющими особый интерес видами *Plasmodium* являются *Plasmodium falciparum* и *Plasmodium vivax*.

Например, если антиген происходит из паразитического организма, предпочтительно из видов *Leishmania*, вызывающих лейшманиоз, указанные соединения можно выбрать из группы, состоящей из источника других белков от паразитического организма, вызывающего паразитарное заболевание, как описано в публикации Iborra S. et al. (Iborra S. et al., 2004, *Vaccine* 22:3865-76). Предпочтительный белковый источник антигенов в данном контексте представляет собой гистон, такой как H2A, H2B, H3, H4, или рибосомный белок, такой как LiP0, L2, L7, L8, L16, S6, L3, L5 и S4. Предпочтительный белок H2A представлен SEQ ID NO: 3. Предпочтительная нуклеиновая кислота, кодирующая H2A, представлена SEQ ID NO: 4. Предпочтительный белок H2B представлен SEQ ID NO: 5. Предпочтительная нуклеиновая кислота, кодирующая H2B, представлена SEQ ID NO: 6. Предпочтительный белок H3 представлен SEQ ID NO: 7. Предпочтительная нуклеиновая кислота, кодирующая H3, представлена SEQ ID NO: 8. Предпочтительный белок H4 представлен SEQ ID NO: 9. Предпочтительная нуклеиновая кислота, кодирующая H4, представлена SEQ ID NO: 10. Предпочтительный белок LiP0 представлен SEQ ID NO: 11. Предпочтительная нуклеиновая кислота, кодирующая LiP0, представлена SEQ ID NO: 12. Предпочтительный белок L2 представлен SEQ ID NO: 13. Предпочтительная нуклеиновая кислота, кодирующая L2, представлена SEQ ID NO: 14. Предпочтительный белок L7 представлен SEQ ID NO: 15. Предпочтительная нуклеиновая кислота, кодирующая L7, представлена SEQ ID NO: 16. Предпочтительный белок L8 представлен SEQ ID NO: 17. Предпочтительная нуклеиновая кислота, кодирующая L8, представлена SEQ ID NO: 18. Предпочтительный белок L16 представлен SEQ ID NO: 19. Предпочтительная нуклеиновая кислота, кодирующая L16, представлена SEQ ID NO: 20. Предпочтительный белок S4 представлен SEQ ID NO: 21. Предпочтительная нуклеиновая кислота, кодирующая S4, представлена SEQ ID NO: 22. Предпочтительный белок S6 представлен SEQ ID NO: 23. Предпочтительная нуклеиновая кислота, кодирующая S6, представлена SEQ ID NO: 24. Предпочтительный белок L3 представлен SEQ ID NO: 25. Предпочтительная нуклеиновая кислота, кодирующая L3, представлена SEQ ID NO: 26. Предпочтительный

белок L5 представлен SEQ ID NO: 27. Предпочтительная нуклеиновая кислота, кодирующая L5, представлена SEQ ID NO: 28.

Другой пример представляет собой использование полипротеинов, содержащих некоторые антигены паразитического организма, как можно видеть у Stober et al., Aebischer et al. и Poot et al. (Stober C.B.U.G. et al., (2006), *Vaccine*, 24:2602-2616, Aebischer T. et al., (2000), *Infection and Immunity*, 68:1328-1336 и Poot J. et al., (2009), *Vaccine*, 27:4439-4446).

В текущем абзаце в качестве белкового источника антигенов также можно использовать гистоновый белок. Предпочтительные соединения включают гистоновый белок или его фрагмент или молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую указанный гистон или указанный фрагмент гистона. Более предпочтительно гистоновый белок представляет собой H2A, H2B, H3 и/или H4, как определено в EP 1687023. Гистоны H2A, H2B, H3 и H4 представляют собой высококонсервативные ядерные белки, и их последовательности хорошо известны в данной области (Requena J.M. et al., 2000, *Parasitol. Today* 16:246-50). Предпочтительно гистоны получают из организма, который является родственным в эволюционном древе, вызывающему заболевание организма. Таким образом, представляющими особый интерес в качестве источника гистонов для применения при лечении паразитарных заболеваний, таких как лейшманиоз, являются простейшие, например, такие как плазмодии. Кроме того, представляющими интерес являются члены семейства трипаносоматид, более конкретно различные виды простейших трипаносоматид *Leishmania*.

Другие предпочтительные соединения включают другой рибосомный белок или его фрагмент или молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую указанный белок или его фрагмент. Примеры других рибосомных белков включают L19 и S4.

Другие предпочтительные соединения включают экстракт рибосомного белка, как определено в WO 2009/090175.

Заболевание может включать, но не ограничиваться этим, аллергию или рак. В контексте изобретения можно использовать любой тип антигена, для которого известно, что он ассоциирован или специфичен для рака. Такой тип антигена также может называться опухолевым антигеном. Опухолевый антиген может представлять собой белковый продукт мутировавшего онкогена или мутировавшего гена-супрессора опухоли, или белковый продукт любого гена или мутировавшего гена, для которого известно, что он экспрессируется в клетках опухоли или раковых клетках. Опухолевый антиген может представлять собой белковый продукт сверхэкспрессированного или ошибочно экспрессированного гена. Опухолевый антиген может представлять собой белковый продукт онкогенного вируса. Опухолевый антиген может представлять собой белковый продукт гена, кодирующего онкофетальные белки. Примеры опухолевого антигена включают белковый продукт следующих генов: альфа-фетопротеина (AFP), раково-эмбрионального антигена (CEA), эпителиального опухолевого антигена (ETA), ассоциированного с меланомой антигена (MAGE), p53 или CD20. Опухолевый антиген, как определено в рамках изобретения, может также являться частью белкового продукта, т.е. полипептидом, пептидом, получаемым из белкового продукта гена, как определено в рамках изобретения.

Предпочтительный раковый антиген включает CD20 или его фрагмент. CD20 экспрессируется в некоторых В-клеточных злокачественных новообразованиях. Предпочтительная аминокислотная последовательность, представляющая CD20, определена как SEQ ID NO: 37. Предпочтительный антиген в этом контексте содержит 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 смежных аминокислот или более SEQ ID NO: 37 и/или обладает по меньшей мере 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или 99% идентичностью или сходством с SEQ ID NO: 37.

Рак может представлять собой аденому желудка и/или опухоль молочной железы. Предпочтительный раковый антиген включает белок S100A2 или его фрагмент. Белок S100A2 представляет собой кальцийсвязывающий белок, экспрессия которого повышается в связи с прогрессированием аденокарциномы желудка (1) и опухоли молочной железы (2) человека. Предпочтительная аминокислотная последовательность, представляющая S100A2, определена как SEQ ID NO: 42. Предпочтительная последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая предпочтительный S100A2, определена как SEQ ID NO: 43. Предпочтительный антиген в этом контексте содержит 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 смежных аминокислот или более SEQ ID NO: 42 и/или обладает по меньшей мере 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или 99% идентичностью или сходством с SEQ ID NO: 42.

Заболевание может представлять собой аллергию. Антиген также может быть ассоциирован или связан с аллергическим заболеванием. Примеры предпочтительных аллергических антигенов включают аллерген из вида *Cupressus*, предпочтительно *Cupressus arizonica* (Cupa4 или Cupa1). Предпочтительная последовательность нуклеиновой кислоты, представляющая последовательность, кодирующую предпочтительный Cupa4, определена как SEQ ID NO: 38. Предпочтительная последовательность нуклеиновой кислоты, представляющая последовательность, кодирующую предпочтительный Cupa1, определена как SEQ ID NO: 39. Предпочтительная аминокислотная последовательность, представляющая предпочтительный Cupa4, определена как SEQ ID NO: 40. Предпочтительная аминокислотная последовательность, представляющая предпочтительный Cupa1, определена как SEQ ID NO: 41. Предпочтительный антиген в

этом контексте содержит 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 смежных аминокислот или более аминокислотной последовательности, кодируемой SEQ ID NO: 38 или 39, и/или обладает по меньшей мере 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или 99% идентичностью или сходством с аминокислотной последовательностью, кодируемой SEQ ID NO: 38 или 39.

Другой предпочтительный антиген в этом контексте содержит 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 смежных аминокислот или более аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 40 или 41, и/или обладает по меньшей мере 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или 99% идентичностью или сходством с аминокислотной последовательностью, представленной SEQ ID NO: 40 или 41.

Однако специалисту будет понятно, что изобретение не ограничено этим конкретным антигеном.

Каждый из антигенов, определенных в настоящем описании (т.е. белки, их части, полипептид или пептид), предпочтительно используют или сливают с полипептидом, являющимся адьювантом, как определено ранее в рамках изобретения. Это значит, что в предпочтительном варианте осуществления кодирующая антиген молекула нуклеиновой кислоты является функционально связанной с молекулой полипептида которой функционирует как адьювант. В более предпочтительном варианте осуществления указанная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая антиген, который является функционально связанным с молекулой нуклеиновой кислоты по изобретению, как определено ранее в рамках изобретения, кодирующей полипептид, который функционирует как адьювант, представляет собой одну отдельную молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую один отдельный полипептид. Указанный полипептид может называться химерным полипептидом. Такой химерный полипептид содержит или состоит из слитого с адьювантом по изобретению антигена. Такой химерный полипептид может содержать одну или несколько дополнительных аминокислот при 5', и/или при 3' и/или между антигеном и адьювантом.

Таким образом, изобретение относится к молекуле нуклеиновой кислоты, как определено ранее в рамках изобретения, кодирующей полипептид, который способен действовать в качестве адьюванта для данного антигена, когда эта последовательность нуклеиновой кислоты функционально связана с нуклеотидной последовательностью, кодирующей указанный антиген. В предпочтительном варианте осуществления такая молекула нуклеиновой кислоты кодирует полипептид, который способен индуцировать антигенспецифический иммунный ответ у индивидуума. Таким образом, настоящее изобретение относится к двум типам молекул нуклеиновой кислоты:

молекуле, содержащей или состоящей из молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей адьювант,

молекуле, содержащей или состоящей из молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей, слитый с молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей антиген.

В зависимости от типа используемого источника (на основе белка или на основе нуклеиновой кислоты) специалисту будет известно, какой тип состава является подходящим. Антиген можно вводить как таковой (голый белок или голую нуклеиновую кислоту). Альтернативно, источник на основе нуклеиновой кислоты можно вводить с использованием конструкции нуклеиновой кислоты, как определено в рамках изобретения. Предпочтительно выбирают состав на основе белка. Более предпочтительно используют химерный полипептид, как определено ранее в рамках изобретения.

В другом варианте осуществления антиген может происходить из вируса. Любой вирус, вызывающий заболевание у людей, антигены которого известны, входит в объем настоящего изобретения.

В другом варианте осуществления антиген может происходить из дрожжей, грибов, аллергена или раковой клетки или любой другой патологической клетки. Любые дрожжи или грибки, которые вызывают заболевание у людей, антигены которых известны, входят в объем настоящего изобретения.

Таким образом, молекула нуклеиновой кислоты по изобретению кодирует полипептид, предпочтительно химерный полипептид, как определено в рамках изобретения, который способен индуцировать антигенспецифический иммунный ответ, когда указанная молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую антиген.

Полипептид.

В дополнительном аспекте изобретение относится к иммуногенному полипептиду, кодируемому молекулой нуклеиновой кислоты, как определено ранее в рамках изобретения. Этот полипептид содержит адьювант и предпочтительно антиген, как определено в предшествующем разделе.

"Полипептид" в рамках изобретения относится к любому пептиду, олигопептиду, полипептиду, продукту гена, продукту экспрессии или белку. Полипептид состоит из последовательных аминокислот. Термин "полипептид" включает молекулы природного происхождения или синтетические молекулы.

Конструкция нуклеиновой кислоты.

В дополнительном аспекте изобретение относится к конструкции нуклеиновой кислоты, содержащей молекулу нуклеиновой кислоты, как определено в предшествующем разделе. Эта конструкция нуклеиновой кислоты может содержать молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид, определяемый как адьювант в предшествующем разделе. Эта конструкция нуклеиновой кислоты может содержать молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид, определяемый как адьювант, и молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую антиген, как определено в предшествующем разделе.

Изобретение также относится к экспрессирующему вектору, содержащему конструкцию нуклеиновой кислоты по изобретению. Предпочтительно экспрессирующий вектор содержит нуклеотидную последовательность по изобретению, которая функционально связана с одной или несколькими контролируемыми последовательностями, которые регулируют продукцию или экспрессию кодируемого полипептида в клетке, у индивидуума или в системе бесклеточной экспрессии. Экспрессирующий вектор можно рассматривать в качестве рекомбинантного экспрессирующего вектора.

Таким образом, молекула нуклеиновой кислоты, как определено в рамках изобретения, кодирующая полипептид, содержащий или включающий в состав, или состоящий из адьюванта, предпочтительно предназначена для применения в качестве лекарственного средства, более предпочтительно в качестве адьюванта. Таким образом, указанный полипептид предпочтительно предназначен для применения в качестве лекарственного средства, более предпочтительно в качестве адьюванта.

Таким образом, молекула нуклеиновой кислоты, как определено в рамках изобретения, кодирующая полипептид, содержащий или включающий в состав, или состоящий из адьюванта и антигена, предпочтительно предназначена для применения в качестве лекарственного средства, более предпочтительно в качестве вакцины против указанного антигена. Таким образом, указанный полипептид предпочтительно предназначен для применения в качестве лекарственного средства, более предпочтительно в качестве вакцины против указанного антигена.

Вакцина по изобретению может действовать как терапевтическая вакцина. Как правило, существует период времени между контактированием с антигеном, т.е. инфекцией и появлением первого симптома заболевания, ассоциированного с указанным антигеном. В этом случае вакцина будет действовать как фармакологический иммунный продукт, который предотвращает и/или лечит заболевание и/или замедляет его прогрессирование, вызывая у хозяина иммунный ответ, который препятствует патологическому действию заболевания. Терапевтическая вакцина отличается от профилактической вакцины тем, что терапевтическая вакцина будет активировать защиту у индивидуума, который уже инфицирован или болен. В другом варианте осуществления вакцина представляет собой профилактическую вакцину. Профилактическую вакцину можно вводить индивидууму до того, как указанный индивидуум контактирует с указанным антигеном.

Лекарственное средство, как определено в рамках изобретения, предпочтительно вводят парентерально, например посредством инъекции или вливания внутривенным, подкожным, интраперитонеальным, внутримышечным, внутриартериальным путем или введением непосредственно в очаг поражения.

Предпочтительным способом введения является подкожное введение. Лекарственное средство можно комбинировать с фармацевтически приемлемой средой или системой доставки известными в данной области общепринятыми способами. Например, лекарственное средство можно растворять в фосфатно-солевом буфере (PBS). Способы получения композиций для парентерального введения хорошо известны в данной области и более подробно описаны в различных источниках, включая, например, Remington's Pharmaceutical Sciences, Ed. AR Gennaro, 20th edition, 2000, Williams & Wilkins, PA, USA. Лекарственное средство предпочтительно вводят в терапевтически эффективной дозе, т.е. в дозе, которая увеличивает способность иммунной системы человека или животного бороться с заболеванием или состоянием, как определено в рамках изобретения. Предпочтительно терапевтически эффективная доза лекарственного средства по изобретению предотвращает и/или замедляет развитие указанного заболевания или состояния. В зависимости от заболевания или состояния специалисту будет известно, какой параметр или симптом, ассоциированный с развитием указанного заболевания, выбирать для того, чтобы следить за развитием заболевания или состояния.

В предпочтительном варианте осуществления лекарственный препарат (или медицинский препарат, или фармацевтическая композиция, или лекарственное средство), как определено в рамках изобретения, применяют для увеличения способности иммунной системы индивидуума бороться против инфекции и/или заболевания, более предпочтительно паразитарной инфекции и/или паразитарного заболевания. В частности, его можно использовать для введения индивидууму, являющемуся человеком или животным. Лекарственный препарат, как определено в рамках изобретения, предпочтительно вводят парентерально, например посредством инъекции или вливания внутривенным, подкожным, интраперитонеальным, внутримышечным, внутриартериальным, интраназальным путем или введением непосредственно в очаг поражения. Предпочтительным способом введения является подкожное введение. Изобретение не ограничено конкретным способом введения лекарственного средства, или молекулы нуклеиновой кислоты, или конструкции нуклеиновой кислоты, или белка, или полипептида, как определено в рамках изобретения. Предпочтительный способ введения представляет собой пероральное введение с использованием капсулы или таблетки. Альтернативно, лекарственное средство, или молекулу нуклеиновой кислоты, или конструкцию нуклеиновой кислоты, или пептид, или полипептид, как определено в рамках изобретения, можно вводить локально посредством катетера, или насоса, или суппозитория. Альтернативно, лекарственное средство, или молекулу нуклеиновой кислоты, или конструкцию нуклеиновой кислоты, или пептид, или полипептид, как определено в рамках изобретения, можно вводить местно. Состав лекарственного средства, или молекулы нуклеиновой кислоты, или конструкции нуклеиновой кислоты, или пептид, или полипептид, как определено в рамках изобретения, или композиции, содержащей указанные соеди-

нения, зависит от предполагаемого способа введения и (терапевтического) применения. Фармацевтический носитель может представлять собой любое совместимое нетоксичное вещество, подходящее для доставки указанного соединения индивидууму. Например, в качестве носителя можно использовать стерильную воду, или инертные твердые вещества, или эксципиенты, как правило, дополняемые фармацевтически приемлемыми адьювантами, буферными средствами, диспергирующими средствами и т.п. Композиции могут находиться в жидкой форме, например, устойчивой суспензии указанного соединения, или в форме композиции, содержащей указанное соединение, или в твердой и/или сухой формах: например порошке. Для перорального и ректального введения указанное соединение можно вводить в твердых лекарственных формах, таких как капсулы, таблетки, суппозитории и порошки, или в жидких лекарственных формах, таких как эликсиры, сиропы, кремы, мази, клизмы и суспензии. Другая форма может представлять собой полутвердую или полужидкую форму, где указанное соединение содержится в виде жидкой формы или на твердой подложке, такой как пластырь.

Лекарственный препарат можно комбинировать с фармацевтически приемлемой средой или системой доставки известными в данной области общепринятыми способами. Например, лекарственное средство, или молекулу нуклеиновой кислоты, или конструкцию нуклеиновой кислоты, или пептид, или полипептид, как определено в рамках изобретения, и необязательно второй адьювант можно растворять в фосфатно-солевом буфере (PBS).

Способы получения композиций для парентерального ведения хорошо известны в данной области и более подробно описаны в различных источниках, включая, например, Remington's Pharmaceutical Sciences, Ed. AR Gennaro, 20th edition, 2000, Williams & Wilkins, PA, USA. Лекарственный препарат предпочтительно вводят в терапевтически эффективной дозе, т.е. дозе, которая увеличивает способность иммунной системы человека или животного бороться с инфекцией и/или заболеванием, как определено в рамках изобретения. Предпочтительно терапевтически эффективная доза медицинского препарата по изобретению способна вызывать иммунный ответ, как определено в рамках изобретения: доза является терапевтически эффективной, когда она способна вызывать собственный иммунный ответ, или индуцировать или индуцировать увеличение собственного иммунного ответа против специфического антигена у получавшего лечение индивидуума, как определено в рамках изобретения. Даже более предпочтительно вызываемый или индуцируемый иммунный ответ представляет собой защитный иммунный ответ. В предпочтительном варианте осуществления лекарственный препарат, как определено в рамках изобретения, представляет собой вакцину. В более предпочтительном варианте осуществления в вакцине используют по меньшей мере 5, 10, 15 или 20 мг молекулы нуклеиновой кислоты, или конструкции нуклеиновой кислоты, или пептида, или полипептида, как определено в рамках изобретения. Указанную вакцину можно вводить по меньшей мере однократно, дважды, три раза, четыре раза или более. Вакцина, как определено в рамках изобретения, может представлять собой профилактическую или терапевтическую вакцину. Объем, в котором можно растворять молекулу нуклеиновой кислоты, или конструкцию нуклеиновой кислоты, или пептид, или полипептид, как определено в рамках изобретения, может варьировать 100-500 мл.

Композиция.

Дополнительно изобретение относится к иммуногенной композиции, содержащей молекулу нуклеиновой кислоты, или конструкцию нуклеиновой кислоты, или пептид, или полипептид и необязательно второй адьювант, предпочтительно Th₁-промотирующий адьювант. Каждое свойство указанной композиции уже было определено в рамках изобретения. В предпочтительном варианте осуществления такая композиция состоит из молекулы нуклеиновой кислоты, или конструкции нуклеиновой кислоты, или пептида, или полипептида, как определено в рамках изобретения, предпочтительный Th₁-промотирующий адьювант представляет собой CpG-ODN. Предпочтительная композиция содержит или состоит из молекулы нуклеиновой кислоты, или конструкции нуклеиновой кислоты, или пептида, или полипептида и необязательно второго адьюванта, предпочтительно Th₁-промотирующего адьюванта, растворенного в PBS или подходящем буфере. Как уже было описано в настоящем описании, антиген может уже содержаться в виде антигена, содержащегося в указанном пептиде или полипептиде, или в виде антигена, кодируемого частью указанной молекулы нуклеиновой кислоты или кодируемого частью молекулы нуклеиновой кислоты, содержащейся в указанной конструкции нуклеиновой кислоты. В дополнительном предпочтительном варианте осуществления в объем настоящего изобретения также включено то, что молекула нуклеиновой кислоты, или конструкция нуклеиновой кислоты, или пептид, или полипептид и необязательно второй адьювант, предпочтительно Th₁-промотирующий адьювант, вводят последовательно. Таким образом, нет необходимости в том, чтобы каждый компонент физически находился в одной отдельной композиции при условии, что их обоих вводят индивидууму.

Такая композиция может дополнительно содержать фармацевтически приемлемый адьювант и/или носитель.

Такая композиция предпочтительно предназначена для применения в качестве лекарственного препарата или в качестве лекарственного средства. Лекарственный препарат предпочтительно представляет собой вакцину. Лекарственный препарат, адьювант и вакцина уже были подробно определены в рамках изобретения.

Композиция может находиться в жидкой, твердой, или полужидкой, или полутвердой форме, как уже было определено в рамках изобретения.

В предпочтительном варианте осуществления другие соединения используют последовательно или одновременно с молекулой нуклеиновой кислоты, или конструкцией нуклеиновой кислоты, или пептидом, или полипептидом для улучшения специфичности терапевтического или профилактического лечения. Предпочтительно, например, использовать другие соединения, которые дополнительно усиливают иммунный ответ получавшего лечение индивидуума. Более предпочтительно такие соединения не содержатся в отдельной композиции совместно с молекулой нуклеиновой кислоты, или конструкцией нуклеиновой кислоты, или пептидом, или полипептидом.

Применение.

Таким образом, изобретение дополнительно относится к применению кодирующей адъювант молекулы нуклеиновой кислоты, как определено в рамках изобретения, и молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей антиген, соответствующий пептид, соответствующий полипептид, соответствующую конструкцию нуклеиновой кислоты и/или соответствующую композицию, для получения лекарственного средства для лечения заболевания или состояния, ассоциированного с антигеном, как определено ранее в рамках изобретения.

Таким образом, изобретение дополнительно относится к применению молекулы нуклеиновой кислоты, как определено в рамках изобретения, содержащей молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую адъювант, функционально связанный с молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей антиген, соответствующий пептид, соответствующий полипептид, соответствующую конструкцию нуклеиновой кислоты и/или соответствующую композицию, для получения лекарственного средства, представляющего собой вакцину для лечения заболевания или состояния, ассоциированного с антигеном.

Каждый признак такого применения уже определен в рамках изобретения.

Способ лечения.

В дополнительном аспекте изобретение относится к способу лечения заболевания или состояния, ассоциированного с антигеном, где указанное лечение включает кодирующую адъювант молекулу нуклеиновой кислоты и молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую антиген, соответствующий пептид, соответствующий полипептид, соответствующую конструкцию нуклеиновой кислоты и/или соответствующую композицию.

Таким образом, изобретение дополнительно относится к способу лечения заболевания или состояния, ассоциированного с антигеном, как определено в рамках изобретения, где указанное лечение включает вакцину, где указанная вакцина содержит молекулу нуклеиновой кислоты, как определено в рамках изобретения, содержащую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую адъювант, функционально связанный с молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей антиген, соответствующий пептид, соответствующий полипептид, соответствующую конструкцию нуклеиновой кислоты и/или соответствующую композицию.

Каждый признак способа уже определен в рамках изобретения.

Определения.

Идентичность последовательности.

"Идентичность последовательности" в рамках изобретения определена как взаимосвязь двух или более аминокислотных (пептидных, полипептидных или белковых) последовательностей или двух или более последовательностей нуклеиновой кислоты (нуклеотидных, полинуклеотидных), как установлено сравнением последовательностей. В данной области "идентичность" также означает степень родства последовательностей аминокислотных последовательностей или последовательностей нуклеиновых кислот соответственно, как установлено совпадением между рядами таких последовательностей. "Сходство" двух аминокислотных последовательностей устанавливается сравнением аминокислотной последовательности и ее консервативных аминокислотных замещений одного пептида или полипептида с последовательностью второго пептида или полипептида. В предпочтительном варианте осуществления идентичность или сходство рассчитывают по всей длине SEQ ID NO, как определено в рамках изобретения. "Идентичность" и "сходство" можно легко рассчитывать известными способами, включая, но, не ограничиваясь ими, такими, как описанные в Computational Molecular Biology, Lesk A.M., ed. Oxford University Press, New York, 1988, Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith D.W., ed. Academic Press, New York, 1993, Computer Analysis of Sequence Data, Part I, Griffin A.M. and Griffin H.G., eds. Humana Press, New Jersey, 1994, Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heine G., Academic Press, 1987 и Sequence Analysis Primer, Gribskov M. and Devereux J., eds. M Stockton Press, New York, 1991, и Carillo H. and Lipman D., SIAM J. Applied Math., 48:1073 (1988).

Предпочтительные способы определения идентичности предназначены для получения максимального совпадения между тестируемыми последовательностями. Способы определения идентичности и сходства кодифицированы в общедоступных компьютерных программах. Предпочтительные способы на основе компьютерных программ для определения идентичности и сходства между двумя последовательностями включают, например, пакет программ GCG (Devereux J. et al., Nucleic Acids Research 12 (1):387 (1984)), BestFit, BLASTP, BLASTN и FASTA (Altschul S.F. et al., J. Mol. Biol. 215:403-410 (1990)). Про-

грамма BLAST X является общедоступной от NCBI и других источников (BLAST Manual, Altschul S. et al., NCBI NLM NIH Bethesda, MD 20894; Altschul S. et al., J. Mol. Biol. 215:403-410 (1990)). Также для определения идентичности можно использовать хорошо известный алгоритм Smith Waterman.

Предпочтительные параметры сравнения полипептидных последовательностей включают следующие: алгоритм: Needleman and Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443-453 (1970); матрицу сравнения: BLOSSUM62 от Hentikoff and Hentikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89:10915-10919 (1992); гэп штраф: 12 и длина штрафного гэта: 4. Пригодная программа с такими параметрами является общедоступной как программа "Ogap" от Genetics Computer Group, расположенной в Мэдисон, WI. Указанные выше параметры представляют собой параметры по умолчанию для сравнений аминокислот (с отсутствием штрафов для концевых пропусков).

Предпочтительные параметры для сравнения нуклеиновых кислот включают следующие: алгоритм: Needleman and Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443-453 (1970); матрицу сравнения: совпадения=+10, несовпадения=0; гэп штраф: 50; длина штрафного гэта: 3. Доступные в виде программы "Gap" от Genetics Computer Group, расположенной в Мэдисон, Wis. Приведенные выше параметры являются параметрами по умолчанию для сравнений нуклеиновых кислот.

Необязательно при определении степени сходства аминокислот специалист также может учитывать так называемые "консервативные" аминокислотные замены, как будет ясно специалисту. Консервативные аминокислотные замены относятся к возможным заменам остатков, содержащих аналогичные боковые цепи. Например, группа аминокислот, содержащих алифатические боковые цепи, представляет собой глицин, аланин, валин, лейцин и изолейцин, группа аминокислот, содержащих алифатические гидроксильные боковые цепи, представляет собой серин и треонин, группа аминокислот, содержащих амидо-содержащие боковые цепи, представляет собой аспарагин и глутамин, группа аминокислот, содержащих ароматические боковые цепи, представляет собой фенилаланин, тирозин и триптофан, группа аминокислот, содержащих основные боковые цепи, представляет собой лизин, аргинин и гистидин, и группа аминокислот, содержащих серосодержащие боковые цепи, представляет собой цистеин и метионин. Предпочтительные группы консервативных аминокислотных замен представляют собой валин-лейцин-изолейцин, фенилаланин-тирозин, лизин-аргинин, аланин-валин и аспарагин-глутамин. Варианты замен последовательности аминокислот, описываемых в настоящем описании, представляют собой такие, в которых по меньшей мере один остаток в описываемых последовательностях удален и на его место вставлен отличный остаток. Предпочтительно аминокислотная замена является консервативной. Предпочтительные консервативные замены для каждой аминокислоты природного происхождения являются следующими: Ala на Ser; Arg на Lys; Asn на Gln или His; Asp на Glu; Cys на Ser или Ala; Gln на Asn; Glu на Asp; Gly на Pro; His на Asn или Gln; Ile на Leu или Val; Leu на Ile или Val; Lys на Arg, Gln или Glu; Met на Leu или Ile; Phe на Met, Leu или Tyr; Ser на Thr; Thr на Ser; Trp на Tyr; Tyr на Trp или Phe и Val на Ile или Leu.

Условия гибридизации.

Условия гибридизации молекулы нуклеиновой кислоты могут включать низкую, или среднюю, или высокую жесткость (способы саузерн-блоттинга). Условия с низкой, или средней, или высокой жесткостью означают предварительную гибридизацию и гибридизацию при 42°C в 5X SSPE, 0,3% SDS, 200 пг/мл разрушенной и денатурированной ДНК из спермы лосося, и даже 25, или 35, или 50% формамида для низких, или средних, или высоких жесткостей соответственно. Затем гибридизационную реакционную смесь промывают три раза в течение 30 мин на каждое промывание с использованием 2XSSC, 0,2% SDS и 55, или 65, или 75°C для низких, или средних, или высоких жесткостей соответственно.

Конструкция нуклеиновой кислоты, экспрессирующей вектор, функционально связанный, экспрессия, контрольные последовательности.

Конструкция нуклеиновой кислоты определена как молекула нуклеиновой кислоты, которую выделяют из гена природного происхождения или которую модифицируют для того, чтобы она содержала сегменты нуклеиновых кислот, которые объединены или расположены рядом способом, не существовавшим иным образом в природе. Молекула нуклеиновой кислоты представлена нуклеотидной последовательностью. Необязательно нуклеотидная последовательность, содержащаяся в конструкции нуклеиновой кислоты, является функционально связанной с одной или несколькими контрольными последовательностями, которые регулируют продукцию или экспрессию указанного пептида или полипептида в клетке или у индивидуума.

"Функционально связанный" определено в рамках изобретения как конфигурация, в которой контрольная последовательность соответствующим образом расположена в положении относительно нуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид по изобретению, так, что контрольная последовательность регулирует продукцию/экспрессию пептида или полипептида по изобретению в клетке и/или у индивидуума.

"Функционально связанный" также можно использовать для определения конфигурации, в которой последовательность (т.е. определяемая как адьювант) соответствующим образом расположена в положении относительно другой последовательности, кодирующей антиген, так, что образуется химерный полипептид (т.е. содержащий слитый с антигеном адьювант) в клетке и/или у индивидуума.

"Функционально связанный" относится к генетическому слиянию последовательности, кодирующей белок, способный действовать как адъювант, как определено в рамках изобретения, с последовательностью, кодирующей антиген, как определено в рамках изобретения, приводящему к химерной последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей химерный белок.

Следует понимать, что экспрессия включает любой этап, входящий в получение пептида или полипептида, включая, но, не ограничиваясь ими, транскрипцию, посттранскрипционную модификацию, трансляцию, посттрансляционную модификацию и выделение.

Определено, что контрольная последовательность в рамках изобретения содержит все компоненты, которые являются необходимыми или предпочтительными для экспрессии полипептида. По меньшей мере, контрольные последовательности содержат промотор и транскрипционные и трансляционные стоп-сигналы. Необязательно промотор, представленный нуклеотидной последовательностью, содержащейся в конструкции нуклеиновой кислоты, является функционально связанным с другой нуклеотидной последовательностью, кодирующей пептид или полипептид, как определено в рамках изобретения.

Экспрессирующий вектор может представлять собой любой вектор, который можно подходить образом подвергать способу на основе рекомбинантной ДНК и который может обеспечивать экспрессию нуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид по изобретению, в клетке и/или у индивидуума. Как используют в рамках изобретения, термин "промотор" относится к фрагменту нуклеиновой кислоты, который функционирует, регулируя транскрипцию одного или нескольких генов или нуклеиновых кислот, предшествующему по отношению к направлению транскрипции участку инициации транскрипции гена. Он зависит от участка связывания, определяемого наличием участка связывания с ДНК-зависимой РНК полимеразой, участков инициации транскрипции и любых других последовательностей ДНК, включая, но, не ограничиваясь ими, участки связывания фактора транскрипции, участки связывания репрессорного белка и белка-активатора, и любых других последовательностей нуклеотидов, для которых специалисту в данной области известно, что они непосредственно или опосредованно действуют, регулируя величину транскрипции от промотора. В контексте изобретения промотор предпочтительно оканчивается на нуклеотиде-1 от участка инициации транскрипции (TSS).

В данном описании и формуле изобретения глагол "содержит" и его спряжения используют в их неограниченном смысле для обозначения того, что следующий за словом предмет является включенным, но предметы, конкретно не указанные, не являются включенными. Дополнительно глагол "состоит" может быть заменен на "по существу, состоит из", означаящим, что продукт, или композиция, или молекула нуклеиновой кислоты, или пептид, или полипептид конструкции нуклеиновой кислоты, как определено в рамках изобретения, может содержать дополнительный компонент(ы), который один раз конкретно описан, где указанный дополнительный компонент(ы) не изменяет характерный признак изобретения. Кроме того, ссылка на элемент в единственном числе не исключает возможности того, что содержится более одного элемента, если из контекста явно не следует, что представлен один и только один из элементов. Таким образом, единственное число, как правило, означает "по меньшей мере один".

Все ссылки на патенты и литературные источники, цитируемые в рамках изобретения, таким образом, полностью включены посредством ссылки.

Следующие ниже примеры предложены только в целях иллюстрации и не предназначены для ограничения каким-либо образом объема настоящего изобретения.

Описание чертежей

Фиг. 1 - твердофазный Kmp 11. Гуморальный ответ против Kmp 11 и против Q. А: ответ IgG против Kmp 11 после интраперитонеального и подкожного введения Kmp 11 (20 мкг). В: ответ IgG против Kmp 11 после интраперитонеального и подкожного введения КААР (5 мкг) и Kmp 11 (1 мкг). С: ответ IgG против Q после интраперитонеального и подкожного введения КААР (5 мкг). D: ответ IgG против Kmp 11 после интраперитонеального и подкожного введения Q (5 мкг)+Kmp 11 (20 мкг). Е: ответ IgG против Q после интраперитонеального и подкожного введения Q (5 мкг)+Kmp 11 (20 мкг). Планки обозначают вариабельность ответа у животных внутри группы.

Фиг. 2. - твердофазный Kmp 11. Гуморальный ответ против Kmp 11 и против Q. А: гуморальный ответ IgG против Kmp 11 после введения КААР (1 мкг) и Kmp 11 (0,25 мкг) интраперитонеально и подкожно. В: гуморальный ответ против Q после введения КААР (1 мкг) интраперитонеально и подкожно. С: ответ IgG1 и IgG2a против Kmp 11 после интраперитонеального и подкожного введения КААР (1 мкг). D: ответ IgG1 и IgG2a против Q после интраперитонеального и подкожного введения КААР (1 мкг). Планки обозначают вариабельность ответа у животных внутри группы.

Фиг. 3 - твердофазный Kmp 11. Гуморальный ответ против Kmp 11 и против Q. А: ответ IgG против Kmp 11 после подкожного введения pRcKmp 11 (20 мкг), КААР (3 мкг) и pRcКААР (20 мкг). В: ответ IgG против Q после подкожного введения КААР (3 мкг) и pRcКААР (20 мкг). С: ответ IgG1 и IgG2a против Kmp 11 после подкожного введения pRcKmp 11 (20 мкг), КААР (3 мкг) и pRcКААР (20 мкг). D: ответ IgG1 и IgG2a против Q после подкожного введения КААР (3 мкг) и pRcКААР (20 мкг). Планки обозначают вариабельность ответа у животных внутри группы.

Фиг. 4 - твердофазный Kmp 11. Продукция цитокинов в неактивированных и активированных КААР клетках селезенки мышей, получавших инъекции PBS, КААР и pRcКААР. Планки обозначают

вариабельность трех повторных определений. Обозначенные на оси Y единицы приведены в пг/мл. По оси X обозначены вакцинируемые группы.

Фиг. 5 - твердофазный Kmp 11. Продукция цитокинов в неактивированных и в активированных Kmp 11 клетках селезенки мышей, получавших инъекции PBS, КААР и pRcКААР. Планки обозначают вариабельность трех повторных определений. Обозначенные на оси Y единицы приведены в пг/мл. По оси X обозначены вакцинируемые группы.

Фиг. 6 - твердофазный Cyp a 4. Животных иммунизировали тремя дозами PBS, 5 мкг СААР, 2 мкг Cyp a 4 и 2 мкг Cyp a 4+3 мкг ААР. Через одну неделю после введения третьей дозы собирали сыворотку, и анализировали реактивность против Cyp a 4. 1А-: IgG-реактивность. 1В-: IgG1-реактивность. 1С-: IgG2a-реактивность. Сыворотку тестировали при разведении 1/2000 для IgG и 1/1000 для IgG1 и IgG2a. Звездочки обозначают статистически значимые различия.

Фиг. 7 - твердофазный Cyp a 4. Животных иммунизировали двумя дозами PBS, 5 мкг СААР, 2 мкг Cyp a 4 и 2 мкг Cyp a 4+3 мкг ААР. Через одну неделю после введения второй дозы собирали сыворотку, и анализировали реактивность против Cyp a 4. 2А-: IgG-реактивность; 2В-: IgG1-реактивность; 1С-: IgG2a-реактивность. Сыворотку тестировали при разведении 1/1600 для IgG и 1/400 для IgG1 и IgG2a. Звездочки обозначают статистически значимые различия.

Фиг. 8 - твердофазный Cyp a 4. IgG-реактивность сыворотки животных, иммунизированных однократной дозой PBS, 1,25 мкг СААР, 0,5 мкг Cyp a 4 и 0,5 мкг Cyp a 4+0,75 мкг ААР. Через одну неделю после введения дозы собирали сыворотку, и анализировали реактивность против Cyp a 4. Сыворотку тестировали при разведении 1/100. Звездочки обозначают статистически значимые различия.

Фиг. 9 - твердофазный Cyp a 4. Животных иммунизировали двумя дозами PBS, 1,25 мкг СААР, 0,5 мкг Cyp a 4 и 0,5 мкг Cyp a 4+0,75 мкг ААР. Через одну неделю после введения второй дозы собирали сыворотку, и анализировали реактивность против Cyp a 4. 4А-: IgG; 4В-: IgG1; 4С-: IgG2a. Сыворотку тестировали при разведении 1/4000 для IgG и 1/100 для IgG1 и IgG2a. Звездочки обозначают статистически значимые различия.

Фиг. 10 - твердофазный S100A2. Реактивность против S100A2 (в единицах оптической плотности). Четыре группы животных (N=5) иммунизировали однократной дозой S100AАР (1,05 мкг), S100A2 (0,3 мкг), ААР (0,75 мкг ААР) и S100A2+ААР (0,3+0,75 мкг). Другой группе животных, используемых в качестве контролей, вводили буфер PBS. Сыворотку получали через 15 суток после введения белков. Сыворотку анализировали при разведении 1/100.

Фиг. 11 - твердофазный S100A2. Реактивность против S100A2 (в единицах оптической плотности). Ту же группу животных, которая обозначена на фиг. 1, иммунизировали S100AАР (1,05 мкг), S100A2 (0,3 мкг), ААР (0,75 мкг ААР) и S100A2+ААР (0,3+0,75 мкг) через 15 суток после введения первой дозы. Сыворотку получали через неделю. (А) IgG-реактивность. (В) IgG1-реактивность. (С) IgG2-реактивность. Сыворотку анализировали при разведении 1/200. Звездочки обозначают наиболее статистически значимые различия.

Фиг. 12 - Cyp a 4 ААР экспрессирующий вектор.

Фиг. 13 - S100A2 ААР экспрессирующий вектор.

Фиг. 14 - реактивность против S100A2 (в единицах оптической плотности) после третьей иммунизации. Ту же группу животных, которая обозначена на фиг. 1, иммунизировали S100AАР (1,05 мкг), S100A2 (0,3 мкг), ААР (0,75 мкг ААР) и S100A2+ААР (0,3+0,75 мкг) через 15 суток после введения второй дозы. Сыворотку получали через одну неделю. (А) IgG-реактивность. (В) IgG1-реактивность. (С) IgG2-реактивность. Сыворотку анализировали при разведении 1/6400. Звездочки обозначают статистически значимые различия ($p < 0,05$).

Примеры

Раздел I.

Вещества и способы.

Животные и иммунизация.

Самок мышей BALB/c в возрасте 6-8 недель приобретали от Harlan Interfauna Iberica S.A. (Barcelona, Spain). Иммунизацию животных проводили интраперитонеальным (ip) или подкожным (sb) путем, как обозначено в легендах as indicated фигур, включенных в раздел результаты. Забор крови у мышей проводили пункцией орбитального синуса.

Конструкция плазмидной ДНК, экспрессирующей химерный ген Kmp 11 ААР.

Последовательности ДНК, кодирующие amino и карбоксильные терминальные участки антигенных детерминант H2A, удаляли из химерного клона pPQ (Soto M. et al., J. Clin. Microbiol., 1998 Jan; 36(1):58-63.) расщеплением Bam HI. Последовательность нуклеиновой кислоты PQ или Q представлена SEQ ID NO: 46. Аминокислотная последовательность PQ или Q представлена SEQ ID NO: 47. Получаемый клон без последовательностей, кодирующих детерминанты H2A, назывался pAАР (SEQ ID NO: 2). Последовательности ДНК, кодирующие белок Kmp 11, получали ПЦР амплификацией последовательности ДНК, кодирующей этот белок, содержащийся в плазмиде pBLS-KMP-11 (Fuentes M.A. et al., J. Biol. Inorg. Chem., 6 (2001), 107-117.), с использованием в качестве праймеров прямые 5'-CGGGATCCTTTAATGGCCACCACGTACGAGGAG-3' (SEQ ID NO: 31) и обратные

5'-CGGGATCCCCCCTTGGATGGGTACTGCGCAGC-3' (SEQ ID NO: 32) олигонуклеотиды. Затем продукт ПЦР, кодирующий белок Kmp 11, расщепляли Bam HI и вставляли в pAAP (расщепленный Bam HI клон pPQ, не содержащий детерминанты H2A) (SEQ ID NO: 33). Получаемый клон, называемый pKmp11AAP, трансформировали в *E. coli* (штамм M15). Химерный очищенный белок, экспрессируемый клоном pKmp11AAP, назывался КААР (SEQ ID NO: 34). В положение 10-12 встраивали триплет ТТА для предотвращения селекции клонов, содержащих вставку последовательности, кодирующей Kmp 11, в обратной ориентации. В положение 9-11 встраивали триплет, кодирующий глицин, для обеспечения подвижности вставки между белком Kmp 11 и фрагментом белка, кодируемым pAAP.

Конструкция плазмиды pRcКААР.

Для конструирования плазмидной ДНК, содержащей последовательность ДНК, кодирующую белок КААР, указанную выше плазмиду pKmp 11 AAP амплифицировали ПЦР с использованием в качестве праймеров прямую 5'-CCCAAGCTTATGGCCACCACCTACGAGGAG-3' (SEQ ID NO:35) и обратную 5'-CATTACTGGATCTATCAACAGG-3' (SEQ ID NO: 36). Последовательность ДНК встраивали в плазмиду pRc/cMV, подвергнутую расщеплению Hind III. Плазмида pRc является коммерчески доступной от Invitrogen. Плазмидные ДНК очищали с использованием не содержащего эндотоксин набора Giga-preparation (Qiagen, Hilden, Germany).

Очистка белка.

Очистку рекомбинантного белка КААР, экспрессируемого клоном pKmp11AAP, а также рекомбинантных белков Q и Kmp 11 (Soto M. et al., *J. Clin. Microbiol.*, (1998) Jan; 36(1):58-63, и Planelles L. et al., *Immunol. Cell Biol.*, (2002), 80(3):241-7), проводили на колонках со смолой на основе нитрилтриуксусной кислоты в условиях денатурации способом, предлагаемым поставщиком (Qiagen).

Экспрессия белков КААР и Kmp 11 pRcКААР.

Клетки COS7 трансфицировали 20 мкг плазмид pRcKmp 11 AAP или pRcKmp 11 с использованием реагента Lipofectin® (Gibco, BRL) согласно протоколу производителя. В кратком изложении 3×10^6 компетентных клеток высевали на 100 мм планшеты в модифицированной Дульбекко среде Игла плюс 5% ЭТС и трансфицировали, когда достигали 50-75% конфлюэнтности. Через 72 ч после трансфекции клетки собирали, дважды промывали ледяным PBS и сразу же лизировали добавлением буфера Лэмбли. Белки разделяли додецилсульфат натрия-электрофорезом в полиакриламидном геле (SDS-PAGE) и переносили на нитроцеллюлозные мембраны (Amersham, Aylesbury, UK). Блоты анализировали с использованием сыворотки мышей, иммунизированных белком КААР. На блотах наблюдали ожидаемого размера полосы белка, реагирующего с антителами к КААР.

Анализ гуморального ответа.

Образцы сыворотки анализировали на специфические антитела к Q или Kmp 11. В кратком изложении стенки стандартного планшета ELISA покрывали 100 мкл PBS, содержащим 2 мкг/мл Q или Kmp 11, в течение ночи при комнатной температуре. Анализ IgG и специфический анализ изотипов проводили с использованием конъюгированных с пероксидазой хрена антител к иммуноглобулинам мыши (Nordic Immunological Laboratories, Tilburg, The Netherlands): разведение антител к IgG и к IgG1 (1:1000) и к IgG2a (1:500). В качестве субстрата использовали дигидрохлорид ортофенилендиамин - OPD (Dako, A/S, Glostrup, Denmark). Через 5 мин реакцию останавливали добавлением 100 мкл 1 M H₂SO₄.

Оптическую плотность определяли при 450 нм.

Анализ цитокинов.

Через одну неделю после последней иммунизации у мышей удаляли селезенки в стерильных условиях на стерильном планшете, содержащем среду DMEM. Суспензии отдельных клеток получали измельчением селезенки с использованием автоклавированной сетки. К ним добавляли 5-10 мл среды DMEM и смешивали содержимое до гомогенного состояния. Светлый супернатант медленно переливали. Клетки осаждали центрифугированием при 4°C при 250g (центрифуга Sorvall RC-5, ротор HB-4) в течение 10 мин. Собирали осадок, содержащий эритроциты и спленоциты. Осадок один раз промывали 0,9% хлоридом аммония для лизиса эритроцитов. Спленоциты от каждой мыши в группе объединяли и ресуспендировали до плотности 10^7 клеток/мл в RPMI, содержащей 10% ЭТС и 0,05 мМ 2-меркаптоэтанола, затем разделяли на 200 мл аликвоты (5×10^5 клеток) в 1,5 мл пробирки Эппендорф. Спленоциты повторно активировали 12 мкг/мл КААР или Kmp 11. Клетки инкубировали в течение 48 ч при 37°C в атмосфере, содержащей 5% CO₂ и 95% влажности. Объединяли супернатанты от мышей из каждой группы (N=4). Все определения проводили в трех повторениях. Для контроля клеточной пролиферации в супернатантах клеток, обработанных ConA (3 мкг/мл), определяли количество IFN-γ и IL-2. В клетках, обработанных ConA, детектировали высокие количества IFN-γ (в 1000 раз больше) и IL-2 (в 200 раз больше) относительно необработанных клеток.

Определение цитокинов.

Концентрации IL-4, IL-6, IFN-γ, TNF-α, IL-17 и IL-10 в супернатантах клеточных культур определяли с использованием набора CBA (BD Biosciences, Singapore) согласно инструкции производителя. Результаты получали с использованием FACS CALIBUR (BD Biosciences, Singapore) и анализировали с использованием программного обеспечения FCAP.

Результаты.

Для того чтобы выяснить, способен ли белок, кодируемый аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1 (AAP), увеличивать или модифицировать гуморальный ответ к ковалентно присоединенному антигену, такому как Kmp 11, мышам вводили белок КААР, экспрессируемый химерным геном, получаемый генетическим слиянием ДНК AAP и Kmp 11. Последовательность AAP получали из описанной выше последовательности Q, не содержащей ДНК, кодирующую amino и карбоксильные терминальные аминокислотные фрагменты, соответствующие антигенам H2A, обладающую 75% идентичностью. В химерном белке КААР белок Kmp 11 составляет 1/4 от нативного белка. Планировали анализ, в котором двум группам по 5 мышей инъецировали три дозы 20 мкг Kmp 11, 5 мкг КААР и 20 мкг Kmp 11-5 мкг Q на сутки 0, 15 и 30. Белки вводили мышам подкожным (sc) или интраперитонеальным (ip) путем. Через одну неделю после введения третьей дозы тестом ELISA определяли IgG-реактивность против Q и Kmp 11. На фиг. 1A показано, что белок Kmp 11 вызывал высокую реактивность против Kmp 11 при введении интраперитонеальным путем, но он был не способен активировать иммунный ответ при введении подкожным путем. Наблюдалось, что после интраперитонеального введения 5 мкг КААР ответ против Kmp 11 также являлся высоким и аналогичным ответу, наблюдаемому при введении 20 мкг одного белка Kmp 11, и, кроме того, высокий ответ активировался после подкожного введения в отличие от отсутствия ответа при введении 20 мкг одного Kmp 11 (фиг. 1B) аналогичным путем. Наблюдали высокий ответ против Q, когда белок КААР вводили интраперитонеально или подкожно (фиг. 1C).

Вследствие того, что высокий ответ против Kmp 11 активировался при введении 5 мкг КААР, и количество Kmp 11 в 5 мкг КААР эквивалентно приблизительно 1 мкг Kmp 11, авторы исследовали, может ли 1 мкг Kmp 11 также индуцировать серологический ответ. На фиг. 1B показано, что белок способен индуцировать незначительный гуморальный ответ против Kmp 11 при интраперитонеальном введении (среднее значение оптической плотности=0,3), но что ответ был значительно ниже ответа, вызываемого после введения 5 мкг КААР. Кроме того, можно наблюдать, как и ожидалось, что не существовало какой-либо реактивности против Kmp 11 после подкожного введения 1 мкг Kmp 11, и наоборот, ответ являлся высоким после введения аналогичного количества Kmp 11, содержащегося в 5 мкг КААР.

Для установления являлось ли увеличение реактивности против Kmp 11 обусловленным совместным введением Kmp 11 и белковых фрагментов, содержащихся в белке Q, белок Kmp 11 вводили смешанным с Q. Наблюдалось, что реактивность против Kmp 11 снижалась, когда смесь вводили интраперитонеально, и что не выявляли ответа против Kmp 11, когда смесь вводили подкожно (фиг. 1D), как свидетельство того, что белковые фрагменты, содержащиеся в Q, не оказывают какого-либо адьювантного действия на Kmp 11. Наблюдали высокую серологическую реактивность против Q (фиг. 1E).

Вследствие высокого серологического ответа, наблюдаемого после введения 5 мкг КААР, авторы анализировали ответ против Q и Kmp 11 после введения 1 мкг КААР. Пять мышей подвергали подкожной инъекции в подушечку стопы на сутки 0 и 15. Ответ IgG и IgG1/IgG2a анализировали через одну неделю после введения второй дозы. В качестве контроля мышам вводили 0,25 мкг Kmp 11, который содержится в количестве, содержащемся в 1 мкг КААР. На фиг. 2A показано, что наблюдали высокий ответ против Kmp 11 после введения 1 мкг КААР интраперитонеальным или подкожным введением, но, что не получали ответа после подкожного или интраперитонеального введения 0,25 мкг Kmp 11. Высокий гуморальный ответ против Q наблюдали, когда КААР вводили интраперитонеальным или подкожным путем (фиг. 2B). Ответ являлся аналогичным ответу, наблюдаемому после введения 3 и 5 мкг КААР (данные не показаны). Тип ответа представлял собой преимущественно тип IgG1 против Kmp 11 или Q (фиг. 2C и D), где отношение IgG1/IgG2a составляло приблизительно 0,5.

Для установления способен ли белок КААР вызывать гуморальный ответ после введения мышам плазмидной ДНК, содержащей ген, кодирующий КААР, анализировали гуморальный ответ IgG, IgG1 и IgG2a против Q и Kmp 11. Группы из 7 мышей инъецировали в подушечку стопы 20 мкг pRcKQ1, 20 мкг pRcKmp 11 и 3 мкг КААР на сутки 0, 15 и 30. Контрольным животным вводили PBS. На фиг. 3 показано, что после введения pRcKAAP детектировали высокую IgG-реактивность против Kmp 11 (фиг. 3A) и Q (фиг. 3B), и что она являлась аналогичной реактивности, детектируемой после введения белка КААР. Однако не получали ответа после введения плазмидной ДНК, содержащей ген, кодирующий один белок Kmp 11. Детектировали сбалансированное отношение IgG1/IgG2a, когда анализировали реактивность против Q (фиг. 3D) после введения КААР или pRcKAAP. Наблюдали незначительное преобладание среднего значения IgG1-реактивности, когда тестировали против Kmp 11 (фиг. 3C).

Продукцию цитокинов анализировали в неактивированных и активированных КААР и Kmp 11 клетках селезенки мышей, получавших инъекцию КААР и pRcKAAP. Антигенспецифическое повышение продукции IFN- γ , IL-6, TNF- α и IL-10 наблюдали в активированных КААР клетках, выделенных у иммунизированных pRcKAAP животных. Не детектировали различий в продукции цитокинов в активированных КААР клетках у иммунизированных PBS и КААР мышей. Вследствие того, что аналогичное увеличение IL-6, TNF- α и IL-10 детектировали в активированных КААР клетках у иммунизированных PBS и КААР мышей, наиболее вероятно, что увеличение продукции цитокинов относительно неактивированных клеток обусловлено неспецифической активацией клеток селезенки, а не КААР специфиче-

ской активацией клеток. Наблюдали аналогичную продукцию IL-17 в активированных КААР клетках селезенки у иммунизированных PBS, КААР и pRcКААР мышей (фиг. 4). Также наблюдали повышенную продукцию IFN- γ и IL-17 после активации Kmp 11 клеток селезенки у иммунизированных pRcКААР животных. Также наблюдали увеличение продукции IL-17 в клетках у иммунизированных КААР мышей. Кроме того, наблюдали неспецифическую продукцию TNF- α , IFN- γ и IL-6 в клеточных культурах, активированных Kmp 11, относительно неактивированных клеток (фиг. 5).

Заключение.

Иммуногенный потенциал Kmp 11 значительно увеличивается при генетическом слиянии с химерным белком, образованным фрагментами из белков Lip2a, Lip2b и P0 из *Leishmania infantum*. Химерный белок, содержащий смесь фрагментов Lip2a, Lip2b и P0 (но не слитый) с Kmp 11, не увеличивает иммуногенный потенциал Kmp 11.

Белок Kmp 11 при введении в качестве ДНК, слитой с фрагментами ДНК, кодирующими антигенные детерминанты белков Lip2a, Lip3b и P0 из *Leishmania infantum*, вызывал высокий гуморальный ответ. Белок Kmp 11 при введении его одного в виде ДНК не вызывает детектируемый гуморальный ответ.

Антигенспецифическое повышение продукции IFN- γ , IL-6, TNF- α и IL-10 наблюдали в активированных КААР клетках, выделенных у иммунизированных pRcКААР животных. Также повышение продукции IFN- γ наблюдали после активации Kmp 11. Такой тип повышения продукции не детектировали в активированных КААР клетках, выделенных у иммунизированных КААР животных.

Белок, получаемый при трансляции *in vitro* последовательности ДНК ААР, можно использовать в качестве средства для промотирования продукции антител против генетически слитого белка. Последовательность ДНК ААР можно использовать в качестве вектора для промотирования иммуногенного потенциала антигена при введении в виде ДНК.

Белок ААР можно использовать в качестве носителя и в качестве адьюванта для индукции иммунного ответа против генетически слитого антигена.

Раздел II.

Вещества и способы.

Конструкция вектора, экспрессирующего СААР (Cup a 4-ААР).

Cup a 4 предварительно клонировали в вектор pQE-30, и он экспрессировался, и его очищали в виде рекомбинантного белка (Molecular cloning and characterization of Cup a 4, a new allergen from *Cupressus arizonica*, *Biochem Biophys Res Commun.* 2010 Oct 22; 401(3):451-7. Yago Pico de Coana, Nuria Parody, Miguel Angel Fuertes, Jeronimo Carnes, Daniela Roncarolo, Renato Ariano, Joaquin Sastre, Gianni Mistrello, Carlos Alonso). Затем белок встраивали в вектор ААР, который получали после расщепления химерного белка КААР Vam H1 для получения фрагмента К (Kmp 11) (этот патент). Получаемый экспрессирующий вектор содержит химерный белок ААР плюс аллерген Cup a 4 *C. arizonica* (фиг. 12). Белок называется СААР.

Экспрессия и очистка белка СААР.

Вектор, кодирующий белок СААР (репортерный белок), трансформировали в экспрессирующий штамм M15 *E. coli* (Qiagen). Экспрессию проводили в стандартных условиях после добавления в течение 5 ч 1 mM IPTG к бактериальной культуре, которую подвергли трансформации вектором СААР. Очистку белка проводили, как описано ранее для КААР.

Результаты.

В предшествующем разделе показано, что иммунный ответ слабого иммуногенного белка значительно повышается, когда он является слитым с фрагментом ААР. Для установления может ли фрагмент ААР также служить в качестве адьюванта и, таким образом, увеличивать иммуногенный потенциал белка, который является высокоиммуногенным даже при отсутствии адьюванта, конструировали вектор СААР. Cup a 4 представляет собой аллергенный белок из *Cupressus arizonica*. Описано, что у 10% пациентов с аллергией к *Cupressus* развивается интенсивный иммунный ответ IgGE против Cup a 4. Для тестирования увеличивает ли ААР, слитый с Cup a 4, иммуногенность Cup a 4, группе мышей (N=5) инъектировали, каждой мыши, 5 мкг рекомбинантного белка СААР, эквивалентных 3 и 2 мкг ААР и Cup a 4 соответственно. Второй группе мышей (N=5) инъектировали, каждой мыши, смесь, составленную из 3 мкг ААР и 2 мкг Cup a 4. Третьей группе мышей (N=5) инъектировали, каждой мыши, 2 мкг белка Cup a 4. Четвертой группе вводили 3 мкг ААР. Все белки растворяли в PBS, и вводили мышам подкожно при отсутствии какого-либо адьюванта.

IgG-реактивность против Cup a 4 определяли при разведении 1/2000. Как и ожидалось, через неделю после введения третьей дозы PBS или ААР не выявляли ответ против Cup a 4 (данные не показаны). На фиг. 6А представлены результаты ответа IgG через неделю после введения третьей дозы Cup 4, СААР, Cup a 4+ААР и ААР. Можно наблюдать, что у иммунизированных Cup a 4 животных ответ IgG был вызван против Cup a 4, как и ожидалось для высокоиммуногенного белка. Ответ изменялся в диапазоне от 0,9 до 2,3 со средним значением 1,4 оптической плотности. Небольшое снижение реактивности против Cup a 4 наблюдали у животных, иммунизированных Cup a 4+ААР. Это свидетельствует о том, что введение ААР, смешанного с Cup a 4, не увеличивает иммуногенность Cup a 4, но, с другой стороны, ААР

конкурирует с Сур а 4. Среднее значение составляло 0,95 оптической плотности. Однако когда белок Сур а 4 вводили в слитом с ААР виде (СААР), наблюдали увеличение ответа у большинства животных. Ответ находился в диапазоне от 1,1 до 2,9 оптической плотности со средним значением 2,2 оптической плотности в отличие от 1,4 оптической плотности, детектируемой для иммунизированных Сур а 4 животных. Аналогичное поведение по отношению к ответу IgG против Сур а 4 в сыворотке у животных, получавших Сур 4, Сур а 4+ААР и СААР и ААР, наблюдали через одну неделю после введения второй дозы (фиг. 7А) в качестве дополнительного подтверждения высокого иммуногенного характера Сур а 4. Для установления влияет ли ААР на модулирование ответа IgG1 и IgG2a, вызываемого против Сур а 4, через одну неделю после введения второй и третьей доз анализировали ответ изотипов IgG1 и IgG2a у животных, иммунизированных Сур 4, Сур а 4+ААР и СААР, (разведение сыворотки 1/400).

На фиг. 7В показано, что через одну неделю после введения второй дозы Сур а 4 также детектировали рассеянную интенсивность IgG1-реактивности в диапазоне от 0,18 до 2,4 оптической плотности (среднее значение 1,1). IgG1-реактивность против Сур а 4 у иммунизированных Сур а 4+ААР животных являлась приблизительно ниже и равной, приблизительно со средним значением 0,7 оптической плотности. Наоборот, среднее значение IgG1-реактивности против Сур а 4 у животных, иммунизированных СААР, было выше (среднее значение 2 оптической плотности), чем аналогичное значение, наблюдаемое у животных, получавших Сур а 4 и Сур а 4+ААР, в качестве дополнительного подтверждения, что ААР действовал как адъювант, когда являлся слитым с антигеном. Также наблюдали аналогичные различия, когда анализировали IgG1-реактивность против Сур а 4 через одну неделю после введения третьей дозы (фиг. 6В), в частности, когда вводили сравниваемую с Сур а 4+ААР смесь. Когда анализировали интенсивность IgG2a-реактивности против Сур а 4 в сыворотке животных, иммунизированных Сур а 4, СААР и Сур а 4+ААР, через одну неделю после третьей дозы, было выявлено, что в сыворотке животных, иммунизированных Сур а 4 и Сур а 4+ААР (фиг. 6С), реактивность являлась равной приблизительно среднему значению 0,8 и 0,6 оптической плотности соответственно. Ответ IgG2a, наблюдаемый в группе СААР, со значениями в диапазоне от 1,1 до 2,9 оптической плотности и средним значением 1,9 оптической плотности был выше, чем аналогичное значение, детектируемое у животных, получавших Сур а 4 и Сур а 4+ААР. Аналогичные наблюдения детектировали, когда анализировали сыворотку, получаемую через одну неделю после второй дозы у животных, получавших Сур 4, Сур а 4+ААР и СААР (фиг. 7С).

Для дополнительного подтверждения ранней адъювантной способности ААР группу животных иммунизировали 1/4 доз белков Сур а 4, СААР и Сур а 4+ААР, используемых в представленном выше эксперименте, (эквивалентных 0,5 мкг Сур а 4, 1,5 мкг СААР и 0,5 мкг Сур а 4+0,75 мкг ААР соответственно). Сыворотку собирали через неделю после первой дозы. IgG-реактивность против Сур а 4 определяли при разведении 1/100. Результаты представлены на фиг. 8. Было выявлено, что несмотря на то, что не выявлено ответа против Сур а 4 у каких-либо животных, иммунизированных Сур а 4 или Сур а 4+ААР, положительные ответы наблюдали у всех животных, иммунизированных СААР. Вновь наблюдали, что ответ изменялся в диапазоне от 0,16 до 1,7 оптической плотности. Таким образом, за исключением одного животного ответ являлся высоким у большинства животных на этой ранней стадии после иммунизации. После введения второй дозы также наблюдали представляющий интерес результат. В группе Сур а 4+ААР индуцируемый ААР ответ конкурирует с ответом, индуцируемым Сур а 4. В действительности не детектировали реактивность против Сур а 4 (фиг. 9А). Интересно то, что конкуренции не возникало, когда антиген являлся слитым с ААР. Для того чтобы подробно определить адъювантную способность ААР сыворотку анализировали при разведении 1/4000 (фиг. 9А). Средняя оптическая плотность сыворотки животных, иммунизированных с СААР, составляла 0,45 оптической плотности, тогда как в сыворотке животных, получавших Сур а 4, она составляла 0,15 оптической плотности. В этой группе реактивность сыворотки против Сур а 4 двух животных являлась близкой к фоновому уровню. Вся сыворотка от животных группы СААР являлась положительной. Разница между реактивностью против Сур а 4 в обеих группах являлась статистически значимой ($p < 0,05$). Когда анализировали ответы IgG1 и IgG2a (разведение 1/100), подтверждали приведенные выше (фиг. 7В и 7С) данные (фиг. 9В и 9С). ААР, когда является слитым с антигеном, направляет ответы по отношению к IgG2a. Р-значение реактивности ответа против Сур а 4 в результате введения СААР относительно Сур а 4 составляло 0,055 и относительно Сур а 4+ААР составляло $p < 0,05$.

Таким образом, представленные данные свидетельствуют о том, что фрагмент белка ААР при введении в слитом с Сур а 4 виде способен не только увеличивать иммунный ответ против высокоиммуногенного белка, такого как Сур а 4, а также способен модулировать тип вызываемого ответа, в частности, по отношению к ответу IgG2a. Такой тип адъювантной активности не наблюдали, когда ААР вводили смешанным с белком Сур а 4. С другой стороны, вероятно, что ААР конкурирует с иммунной активностью антигена.

Раздел III.

Получение экспрессирующего вектора S100AAP.

После ПЦР амплификации фрагмента ДНК S100A2 в векторе pDEST-17 Invitrogen (лабораторный исходный раствор) с использованием праймеров 5' -AAGGATCCATGTGCAGTTCTCTGGAG-3' (SEQ ID NO: 44) и 5' -AACTTAAGCAGGGTCGGTCTGGGCAG-3' (SEQ ID NO: 45) его субклонировали в вектор

pST Blue-1 (участки рестрикции Bam HI и Afl II показаны курсивом). Затем его субклонировали в модифицированный вектор AAP (в вектор PQE30), который синтезировали содержащим необходимые участки рестрикции. Получаемый экспрессионный вектор содержит три фрагмента химерного белка AAP плюс фрагмент ДНК S100A2 (фиг. 13). Этот вектор трансформировали в экспрессирующий штамм M15 E.coli (Qiagen). Экспрессию проводили в стандартных условиях: индукция 0,8 оптической плотности при 450 нм культуры с 1 mM IPTG в течение 5 ч. Получаемый вектор назывался S100AAP. Белок S100A2 экспрессировался в вектор PQE30.

В предшествующем разделе показано, что иммунный ответ против паразитарного слабого иммуногенного белка (Kmp 11) является значительно повышенным, когда он является слитым с последовательностью ДНК AAP, и что иммунный ответ против растительного высокоиммуногенного белка (Cup a 4) также является повышенным, когда он является слитым с последовательностью ДНК AAP. Также показано, что способность AAP увеличивать иммуногенность репортерного белка являлась эффективной только, когда репортерный белок являлся генетически слитым с AAP. Для установления, может ли фрагмент AAP также служить в качестве адьюванта и, таким образом, увеличивать иммуногенный потенциал белка млекопитающего, конструировали вектор S100AAP. Белок S100A2 представляет собой кальций-связывающий белок, экспрессия которого повышается в связи с прогрессированием аденокарциномы желудка (1) и опухоли молочной железы (2) человека. Для исследования увеличивает ли AAP, слитый с S100, иммуногенность репортерного белка, группе мышей (N=5) инъецировали, каждой мыши, 1,05 мкг рекомбинантного белка S100AAP, эквивалентного 0,75 и 0,3 мкг AAP и S100A2 соответственно. Второй группе мышей (N=5) инъецировали, каждой мыши, смесь, составленную из 0,75 мкг AAP и 0,3 мкг S100A2. Третьей группе мышей (N=5) инъецировали, каждой мыши, 0,3 мкг S100A2. Четвертой группе вводили 0,75 мкг AAP. Все белки растворяли в PBS и вводили мышам подкожно. В качестве контроля другой группе мышей (N=5) инъецировали, каждой мыши, буфер (PBS). На фиг. 10 показан общий ответ IgG против S100A2 при разведении 1/100 через одну неделю после введения первой дозы. Как и ожидалось, было выявлено, что для сыворотки мышей, иммунизированных AAP или PBS, не показана никакая-либо положительная реактивность против S100A2. За исключением одной мыши, реактивность против S100A2 снижалась, когда белок вводили смешанным с AAP, как ранее описано для Cup a 4, в качестве подтверждения конкурентного действия двух иммуногенных белков при введении их в виде смеси (реактивность сыворотки одного животного являлась отрицательной). Данные мышей, иммунизированных одним белком S100A2, свидетельствуют о том, что белок также является иммуногенным у мышей при отсутствии адьюванта, т.к. даже вводимое небольшое количество белка было способно индуцировать низкий, но положительный ответ (средняя оптическая плотность=0,41). Несмотря на то, что было выявлено, что не существовало какого-либо конкурирования между AAP и S100A2 у мышей, иммунизированных S100AAP, но, с другой стороны, реактивность против S100A2 повышалась (30%), когда вводимый белок являлся слитым с AAP (средняя оптическая плотность=0,54). Как показано на фиг. 11А, отчетливо наблюдали адьювантную способность AAP, когда он являлся слитым с репортерным белком, после введения второй дозы S100AAP, S100A2, AAP+S100A2 и AAP (1,05 мкг S100AAP, 0,3 мкг S100A2, 0,75 мкг AAP плюс 0,3 мкг S100A2 и 0,75 мкг AAP). Детектировали статистически значимое различие реактивности против S100A2 сыворотки животных, иммунизированных S100AAP, и животных, иммунизированных одним белком S100A2. В соответствии с указанными выше наблюдениями в отношении реактивности против Kmp 11 и Cup a 4 после введения AAP, не слитого с репортерными белками, детектировали, что AAP не обладал какой-либо адьювантной способностью, когда он не являлся слитым с репортерным белком S100A2. С другой стороны, вероятно, возникает иммунное конкурирование между двумя белками. Таким образом, из трех экспериментов можно сделать вывод о представляющем интерес иммунологическом свойстве, т.к. необходимо, чтобы AAP являлся слитым с репортерным белком для проявления адьювантного эффекта. Другими словами, это значит, что приобретенная адьювантная способность AAP возникает, когда он является генетически слитым с репортерным белком. Кроме того, адьювантный эффект наблюдали, когда анализировали типы ответов (фиг. 11В). Было детектировано, что после введения S100AAP повышалась только одна IgG-реактивность против S100A2 относительно реактивности против S100A2 после введения S100A2 или AAP+S100A2, но это повышение реактивности также наблюдали, когда анализировали тип IgG2a. Среднее значение отношения IgG1/IgG2a-реактивности, наблюдаемой после введения S100A2, составляло 2,1, тогда как оно составляло 0,95, когда животных иммунизировали S100AAP в качестве подтверждения того, что адьювантная эффективность AAP, когда он является слитым с репортерным геном, активирует ответ IgG1-IgG2a по отношению к IgG2a. В соответствии с указанными выше наблюдениями в отношении ответа IgG, когда животных иммунизировали смесью белков, было выявлено, что IgG1-реактивность сыворотки животных, иммунизированных S100AAP, являлась значительно выше по сравнению с сывороткой животных, иммунизированных AAP+S100A2. Среднее значение ответа IgG2a в обоих случаях являлось сходным как дополнительное подтверждение способности AAP оказывать действие по отношению к IgG2a, только когда он является слитым с репортерным белком.

1. Identification of potential biomarkers for early and advanced gastric adenocarcinoma detection. Economescu M.C., Necula L.G., Dragu D., Badea L., Dima S.O., Tudor S., Nastase A., Popescu I., Diaconu

C.S. Hepatogastroenterology. 2010 Nov-Dec; 57 (104):1453-64.

2. McKiernan E., McDermott E.W., Evoy D., Crown J., Duffy M.J. The role of S100 genes in breast cancer progression. Tumour Biol. 2011 Jun; 32 (3):441-50.

Адьювантную способность ААР по отношению к S100A2 дополнительно, даже более отчетливо, наблюдали после введения третьей дозы, как указано.

В качестве дополнительного подтверждения адьювантной способности ААР анализировали сыворотки одних и тех же животных, получаемые после введения третьей дозы антигенов. На фиг. 14 показан ответ против S100A2. После кривой титрования разведения используемой для анализа сыворотки выбрали разведение 1/6400, т.к. это является разведением, при котором лучшим образом выявляют адьювантную способность ААР. Отчетливо было детектировано, что реактивность против S100A2 сыворотки животных, иммунизированных S100AАР, является значительно выше, чем реактивность, наблюдаемая в сыворотке животных, иммунизированных даже смесью белка S100A2. Для установления модулирует ли ААР гуморальный ответ, анализировали ответ IgG1 и IgG2a. Было выявлено, что увеличение наблюдали для обоих типов ответов. Когда вводили один белок, среднее отношение IgG2a/IgG1 составляло 0,45. Однако среднее отношение IgG2a/IgG1 составляло 1,6, когда ААР являлся слитым с S100A2 как подтверждение того, что ААР модулирует ответ IgG2a. Следует отметить, что, кроме того, ААР также модулирует ответ IgG2a, когда его вводят смешанным с S100A2 (среднее отношение IgG2a/IgG1 равно 1,1).

SEQ ID NO: 2

```
GGATCCTCTAGACCCATGTCCACCAAGTACCTCGCCGCGTACGCTCTGGCCTCCCTGAG
CAAGGCGTCCCCGTCTCAGGCGGACGTGGAGGCTATCTGCAAGGCCGTCCACATCGACG
TCGACCAGGCCACCCTCGCCTTTGTGTATGGAGAGCGTTACGGGACGCGACGTGGCCACC
CTGATCGCGGAGGGCGCCGCAAGATGAGCGGATGCCGCGGCCAGCTCTGGTGCCCGC
TGCTGGCGTCACTGCTCCGCTGCGGGTATGCGGCTCCGGCTGCCCGCGTGTAAGA
AGGACGAGCCGGAGGAGGAGGCGGACGACACATGGGCCCTCTAGAGTCGACCCCATG
CAGTACCTCGCCGCGTACGCCCTCGTGGCGATGTCTGGCAAGACGCCGTGCAAGGCGGA
CGTTCAGGCTGTCTGAAGGCCCGCGGCTTGGCGTGGATGCCTCCCGGTGGATGCCG
TCTCCAGGAGGTGGAGGGCAAGAGCTTCGATGCGCTGGTGGCCGAGGGCCGACGAAG
CTGGTGGGCTCTGGCTCTCCGCTCTGCTGGCGTGTCTCACTGCTGGTGGCCGCGC
TGCGCGGTGGCCGAGGCGAAGAAGGAGGAGCCCGAGGAGGAGGAGGCCGATGATGACA
TGGGCCCCGTGACCTGCAGCCCGCGCTGCCGCGCCGCGCCCTAGCGCCGCTGCC
AAGGAGGAGCCGGAGGAGACGACGAGGACGACTTCGGCATGGGCGGTCTCTTCTAA
```

SEQ ID NO: 1

```
GSSRPMSTKYLAAYALASLSKASPSQADVEAICKAVHIDVDQATLAFVMESVTGRDVAT
LIAEGAAKMSAMPAASSGAAAGVTASAAGDAAPAAAAAKKDEPEEEADDDMGPSRVDPDM
QYLAAYALVAMSGKTPSKADVQAVLKAAGVAVDASRVDAVFQEVGKSFDAALVAEGRTK
LVGSGSAAPAGAVSTAGAGAVAEAKKEEPEEEADDDMGPVLDLQPAAPAAAPSAAA
KEEPEEDEDDFGMGGLF
```

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Молекула нуклеиновой кислоты, выбранная из:

i) нуклеиновых кислот, кодирующих иммуногенный полипептид ААР, состоящий из Lip2b, Lip2a и LiPO-St и имеющий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 50% идентична последовательности SEQ ID NO: 1 по всей ее длине,

ii) нуклеиновых кислот, содержащих нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 50% идентична последовательности SEQ ID NO: 2 по всей ее длине,

причем молекула нуклеиновой кислоты не содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, по меньшей мере на 85% идентичный последовательности SEQ ID NO: 3 по всей ее длине,

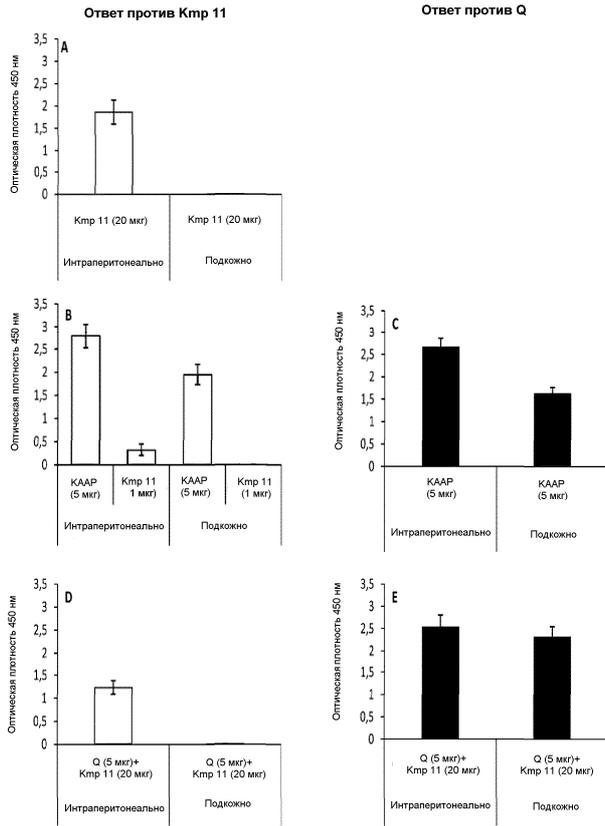
причем молекула нуклеиновой кислоты функционально связана с нуклеотидной последовательностью, кодирующей антиген, для которого молекула нуклеиновой кислоты служит адьювантом.

2. Молекула нуклеиновой кислоты по п.1, где указанный антиген происходит из любого организма, для которого известно, что он ассоциирован с каким-либо заболеванием или состоянием у индивидуума.

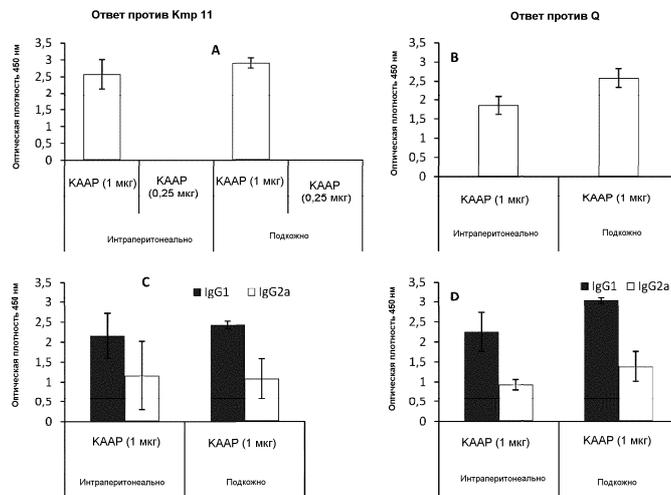
3. Молекула нуклеиновой кислоты по п.1 или 2, где указанный антиген является аутологическим или аутоантигеном или происходит из вируса или микроорганизма, такого как бактерия, дрожжи, грибок или паразитический эукариотический организм.

4. Иммуногенный полипептид, кодируемый молекулой нуклеиновой кислоты, охарактеризованной в п.1, которая функционально связана с нуклеотидной последовательностью, кодирующей антиген, для которого полипептид служит адьювантом.

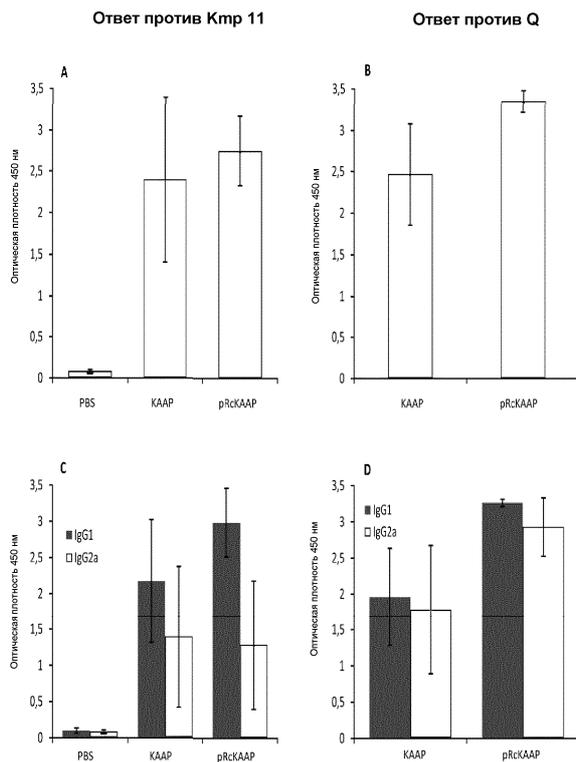
5. Иммуногенный полипептид, кодируемый молекулой нуклеиновой кислоты, охарактеризованной в п.2 или 3, которая функционально связана с нуклеотидной последовательностью, кодирующей антиген, для которого полипептид служит адьювантом.
6. Конструкция нуклеиновой кислоты, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты по п.1.
7. Конструкция нуклеиновой кислоты, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты по п.2 или 3.
8. Иммуногенная композиция, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты по п.1, и/или полипептид по п.4, и/или конструкцию нуклеиновой кислоты по п.6.
9. Иммуногенная композиция, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты по п.2 или 3, и/или полипептид по п.5, и/или конструкцию нуклеиновой кислоты по п.7.
10. Применение молекулы нуклеиновой кислоты по п.1 для получения лекарственного средства для лечения заболевания или состояния, ассоциированного с антигеном, охарактеризованным в любом из пп.1-3.
11. Применение молекулы нуклеиновой кислоты по п.2 или 3 в качестве лекарственного средства для лечения заболевания или состояния, ассоциированного с антигеном, охарактеризованным в любом из пп.1-3.
12. Применение полипептида по п.4 для получения лекарственного средства для лечения заболевания или состояния, ассоциированного с антигеном, охарактеризованным в любом из пп.1-3.
13. Применение полипептида по п.5 в качестве лекарственного средства для лечения заболевания или состояния, ассоциированного с антигеном, охарактеризованным в любом из пп.1-3.
14. Применение конструкции нуклеиновой кислоты по п.6 для получения лекарственного средства для лечения заболевания или состояния, ассоциированного с антигеном, охарактеризованным в любом из пп.1-3.
15. Применение конструкции нуклеиновой кислоты по п.7 в качестве лекарственного средства для лечения заболевания или состояния, ассоциированного с антигеном, охарактеризованным в любом из пп.1-3.
16. Применение композиции по п.8 для получения лекарственного средства для лечения заболевания или состояния, ассоциированного с антигеном, охарактеризованным в любом из пп.1-3.
17. Применение композиции по п.9 в качестве лекарственного средства для лечения заболевания или состояния, ассоциированного с антигеном, охарактеризованным в любом из пп.1-3.
18. Применение молекулы нуклеиновой кислоты по п.2 или 3 для получения лекарственного средства, являющегося вакциной, для лечения заболевания или состояния, ассоциированного с антигеном, охарактеризованным в любом из пп.1-3.
19. Применение полипептида по п.5 для получения лекарственного средства, являющегося вакциной, для лечения заболевания или состояния, ассоциированного с антигеном, охарактеризованным в любом из пп.1-3.
20. Применение конструкции нуклеиновой кислоты по п.7 для получения лекарственного средства, являющегося вакциной, для лечения заболевания или состояния, ассоциированного с антигеном, охарактеризованным в любом из пп.1-3.
21. Применение композиции по п.9 для получения лекарственного средства, являющегося вакциной, для лечения заболевания или состояния, ассоциированного с антигеном, охарактеризованным в любом из пп.1-3.
22. Способ лечения заболевания или состояния, ассоциированного с антигеном, охарактеризованным в любом из пп.1-3, включающий введение вакцины, содержащей молекулу нуклеиновой кислоты по п.2 или 3, полипептид по п.5, конструкцию нуклеиновой кислоты по п.7 и/или композицию по п.9.
23. Способ лечения заболевания или состояния, ассоциированного с антигеном, охарактеризованным в любом из пп.1-3, включающий введение молекулы нуклеиновой кислоты по п.1, полипептида по п.4, конструкции нуклеиновой кислоты по п.6 и/или композиции по п.8.



Фиг. 1

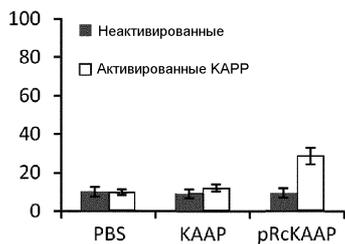


Фиг. 2

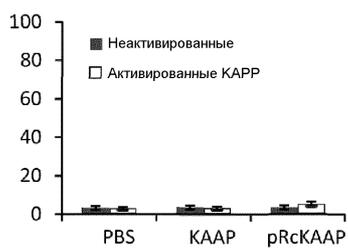


Фиг. 3

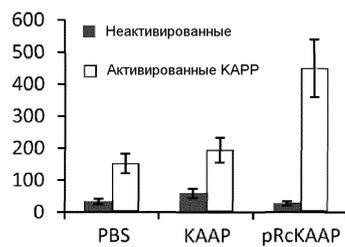
IL-2



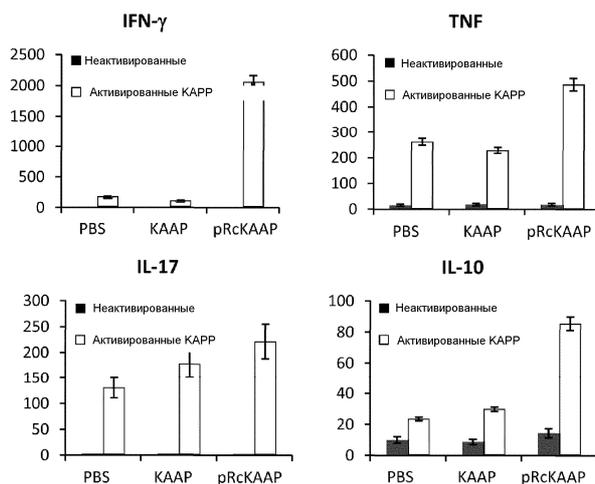
IL-4



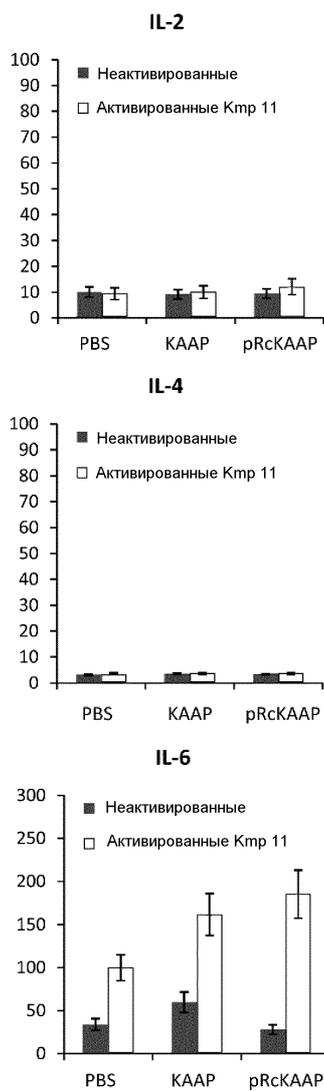
IL-6



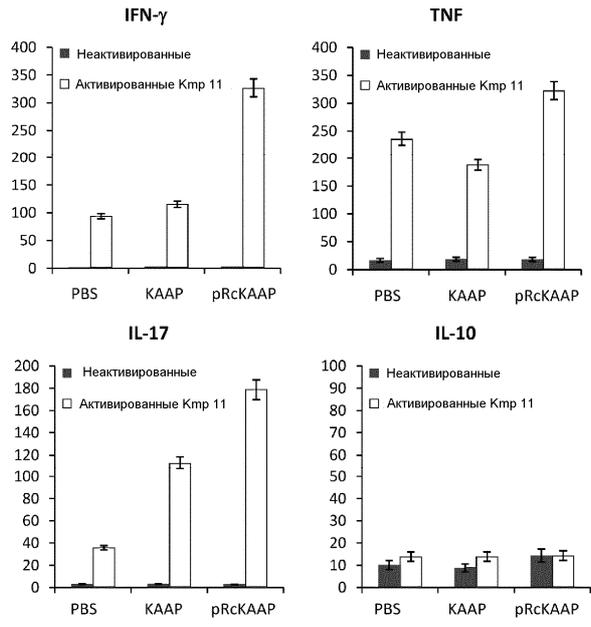
Фиг. 4.1



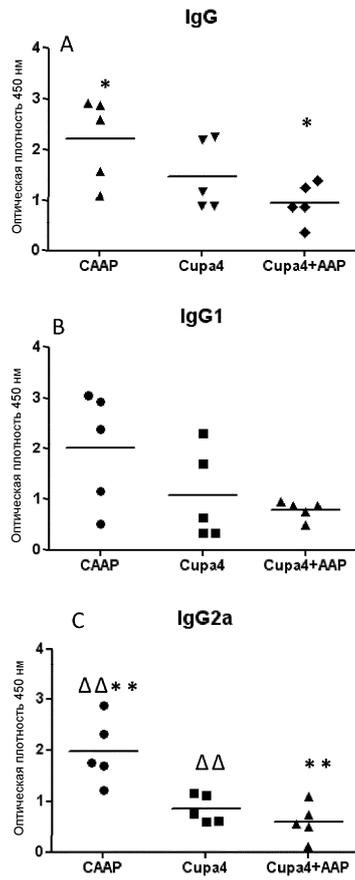
Фиг. 4.2



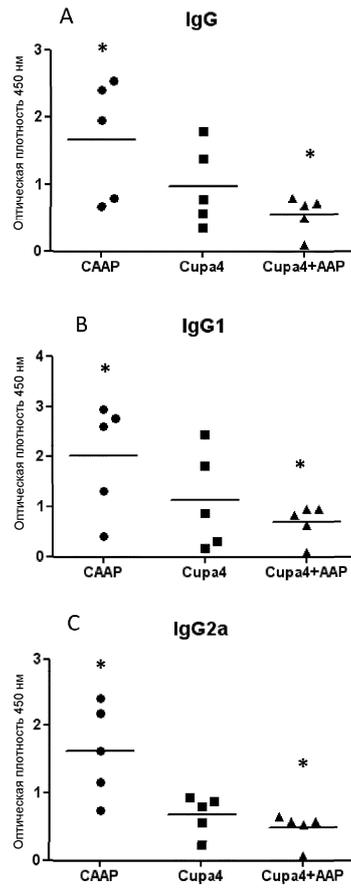
Фиг. 5.1



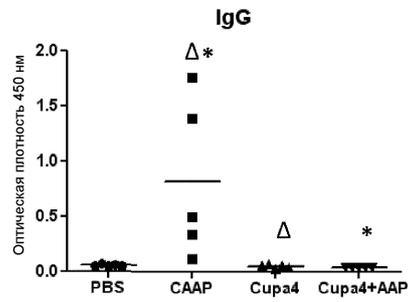
Фиг. 5.2



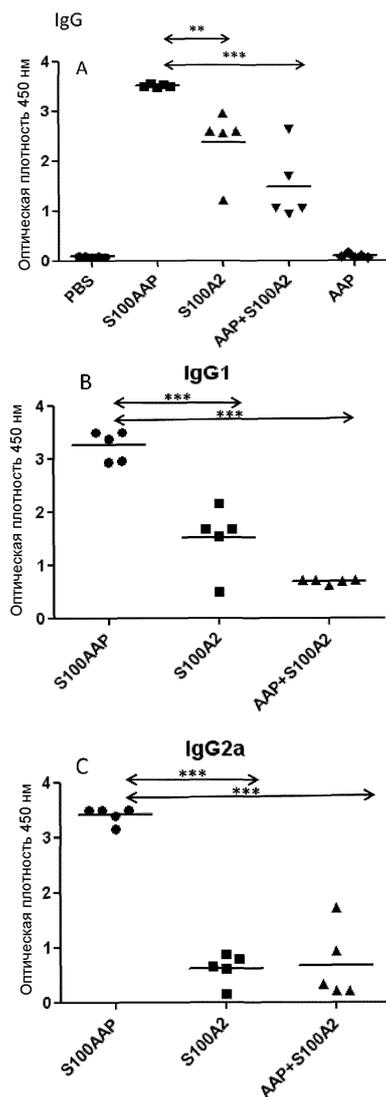
Фиг. 6



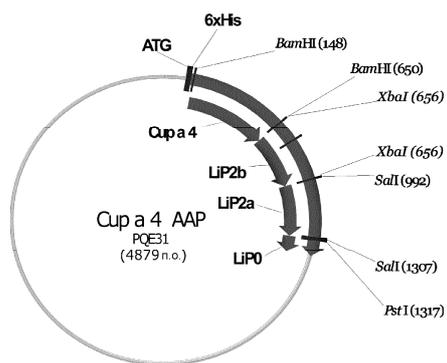
Фиг. 7



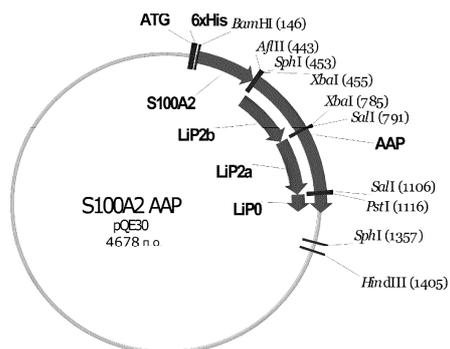
Фиг. 8



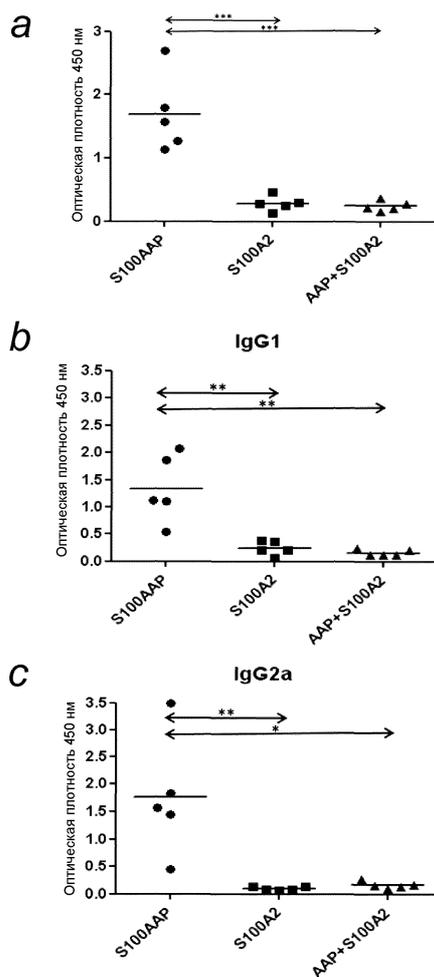
Фиг. 11



Фиг. 12



Фиг. 13



Фиг. 14

