

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **034928**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.04.08

(21) Номер заявки
201690884

(22) Дата подачи заявки
2014.10.28

(51) Int. Cl. **A61K 48/00** (2006.01)
C12N 9/12 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)

(54) КОНСТРУКЦИЯ НУКЛЕИНОВОЙ КИСЛОТЫ ДЛЯ ИНДУКЦИИ ИММУННОГО ОТВЕТА У СУБЪЕКТА ПРОТИВ КЛЕТОК, СВЕРХЭКСПРЕССИРУЮЩИХ ТЕЛОМЕРАЗУ, И ЕЕ ПРИМЕНЕНИЕ

(31) 13190547.3

(32) 2013.10.28

(33) EP

(43) 2016.11.30

(86) PCT/EP2014/073164

(87) WO 2015/063117 2015.05.07

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ИНВЕКТИС (FR)

(72) Изобретатель:
**Ланглад Демуайен Пьер, Уэйн-Хобсон
Симон, Юэ Тьери, Лиар Кристель,
Плике Элоди (FR)**

(74) Представитель:
Бадаева Т.Н., Фелицына С.Б. (RU)

(56) WO-A1-2008043760

YANG YINHUA ET AL.: "Nucleolar localization of hTERT protein is associated with telomerase function", EXPERIMENTAL CELL RESEARCH, 15 JUL 2002, vol. 277, no. 2, 15 July 2002 (2002-07-15), pages 201-209, XP002722434, ISSN: 0014-4827, abstract

RUDEN MARIA ET AL.: "Novel anticancer therapeutics targeting telomerase", CANCER TREATMENT REVIEWS, vol. 39, no. 5, 1 August 2013 (2013-08-01), pages 444-456, XP028593060, ISSN: 0305-7372, DOI: 10.1016/J.CTRV.2012.06.007, figure 4; table 1

BOLONAKI IRINI ET AL.: "Vaccination of patients with advanced non-small-cell lung cancer with an optimized cryptic human telomerase reverse transcriptase peptide", JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY: OFFICIAL JOURNAL OF THE AMERICAN SOCIETY OF CLINICAL ONCOLOGY, 1 JUL 2007, vol. 25, no. 19, 1 July 2007 (2007-07-01), pages 2727-2734, XP002722435, ISSN: 1527-7755, the whole document

(57) Изобретение относится к конструкции нуклеиновой кислоты, содержащей последовательность, кодирующую белок обратной транскриптазы теломеразы человека, который лишен каталитической активности теломеразы и сигнала ядрышковой локализации. Заявленная конструкция предназначена для индукции иммунного ответа у субъекта против клеток, сверхэкспрессирующих теломеразу, предпочтительно диспластических клеток или опухолевых клеток. Кроме того, изобретение относится к применению заявленной конструкции для профилактики или лечения опухоли у субъекта.

B1

034928

034928

B1

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к области вакцинации против опухолей. Более конкретно, изобретением предусмотрены нуклеиново-кислотные конструкции, кодирующие неактивную энзиматическую форму белка обратной транскриптазы теломеразы человека.

Уровень техники

Стимуляция опухолеспецифичных Т-клеточных реакций при активной иммунотерапии имеет ряд теоретических преимуществ перед другими формами лечения рака. Для того чтобы получить клиническую отдачу, иммунотерапия на основе Т-клеток должна стимулировать ответы реагирующих на опухоли Т-клеток CD8 и Т-клеток CD4, которые распознают опухолеспецифичные антигены. Поэтому все больше внимания уделялось идентификации эпитопов МНС класса I и II у множества ассоциированных с опухолью антигенов (ТАА) (Cheever et. al., 2009). Однако гетерогенная экспрессия большинства изученных опухолевых антигенов среди различных видов рака ограничивает широкое применение вакцин против рака, нацеленных на такие антигены. В течение нескольких последних лет в качестве первого поистине общего опухолевого антигена появилась обратная транскриптаза теломеразы человека (hTERT), которая активно исследовалась в качестве универсальной мишени для иммунотерапии рака. Обратная транскриптаза теломеразы человека (hTERT) является каталитической субъединицей фермента теломеразы, который синтезирует ДНК теломеров на концах хромосом. hTERT гиперэкспрессируется в большинстве опухолей человека (>85%) и практически при всех видах рака. Кроме того, активация теломеразы оказалась одним из наиболее важных механизмов избегания у опухолей, который позволяет им обойти зависимые от теломеразы пути клеточной смерти. Хорошо установлено, что терапевтические стратегии, направленные на антигены, не задействованные в росте опухолей, могут привести к отбору потерявших антиген опухолевых мутантов, которые клинически прогрессируют. Следовательно, понижающая регуляция или потеря активности теломеразы будет серьезно влиять на потенциал роста опухолевых клеток. Более того, теломераза сравнительно специфична к раковым клеткам, так как нормальные клетки организма почти или совсем не экспрессируют теломеразу на протяжении большей части своей жизни и обычно имеют более длинные теломеры, чем в опухолевых клетках. Все эти результаты оправдывают клиническое применение hTERT для противораковой иммунотерапии.

Пептидная вакцинация, которая широко применяется в ряде испытаний вакцин против рака, является наиболее продвинутой стратегией в отношении антигена hTERT. Однако на оптимальный исход такой стратегии вакцин на основе пептидов могут повлиять несколько факторов, таких как (1) рестрикция лейкоцитарных антигенов человека (HLA), (2) естественный процессинг пептидов в опухолевых клетках, (3) потеря презентации антигена на опухолевых клетках, (4) функциональность антигенспецифичных Т-клеток и (5) долгосрочная сохранность иммунных ответов у хозяина после вакцинации.

Реакция памяти, вырабатываемая с помощью пептидных вакцин и особенно коротких пептидов, очень коротка и не является постоянной. Эти субоптимальные результаты могут частично объясняться отсутствием содействия со стороны Т-клеток CD4. Кроме того, период полураспада комплекса МНС/вакцинный пептид на презентующих клетках составляет лишь несколько часов, после чего пептиды исчезают. При этом дендритные клетки уже больше не презентуют пептиды лимфоцитам, т.е. становятся толерогенными. Этот дефект в презентации пептидов может в некоторых случаях приносить вред (Rosenberg et. al., 2004).

Сущность изобретения

Авторы изобретения теперь разработали такую стратегию ДНК-вакцины, которая не проявляет недостатков пептидной (даже использующей длинные пептиды) вакцинации, приуроченной к определенным эпитопам hTERT. В частности, ДНК-вакцинация позволяет избежать дорогостоящих и сложных процедур получения и очистки белка. Кроме того, ДНК-вакцина, кодирующая белок hTERT, дает возможность индуцировать хелперные Т-клетки CTL и CD4, независимо от HLA-рестрикции у пациента, и в то же время она безопасна и вызывает количественно и качественно лучший иммунный ответ.

Изобретением предусмотрена конструкция нуклеиновой кислоты, содержащая:

- i) последовательность, кодирующую белок обратной транскриптазы теломеразы человека (hTERT), который лишен каталитической активности теломеразы и сигнала ядрышковой локализации и который слит на N-конце с убиквитином или кальретикулином; и
- ii) регуляторную последовательность, которая обеспечивает экспрессию белка.

В данной конструкции белок hTERT лишен каталитической активности теломеразы посредством делеции аминокислот, которые соответствуют аминокислотам V867, D868, D869 hTERT дикого типа (SEQ ID NO: 2), а делеция, по меньшей мере, аминокислот 1-23 по сравнению с белком hTERT дикого типа (SEQ ID NO: 2) лишает белок hTERT сигнала ядрышковой локализации. Указанное слияние белка hTERT с убиквитином или кальретикулином повышает адресацию белка hTERT на протеасомы.

Конструкции по изобретению предназначены для индукции иммунного ответа у субъекта, предпочтительно клеточного иммунного ответа, против клеток, гиперэкспрессирующих теломеразы.

В другом аспекте изобретения предусмотрено применение данной конструкции в целях индукции иммунного ответа у субъекта против клеток, сверхэкспрессирующих теломеразу. Предпочтительно это диспластические клетки или опухолевые клетки, а также клетки, инфицированные онковирусами.

Такое применение запускает иммунный ответ против опухоли, в особенности ответ цитотоксических Т-клеток CD8, вместе со специфической реакцией Т-клеток CD4.

Широкий клеточный иммунитет возникает потому, что репертуары Т-клеток CD4 и CD8 стимулируются эпитопами, доступными на hTERT. Количество Т-клеток CD4 и CD8, направленных против многих эпитопов hTERT, больше, чем при пептидной вакцинации. В дополнение к индукции Т-клеток CD4, улучшается выработка интерлейкинов, особенно цитокинов Th1, что способствует оптимальному росту и дифференцировке Т-клеток CD8 с отличительными признаками противораковых клеток.

Краткое описание фигур

Фиг. 1А. Карта плазмиды INVAC-1.

Расположение (нуклеотиды)	Последовательность	Источник
1-3478	вектор NTC8685-eRNA41H-HindIII-XbaI	NTC
3479-3484	сайт клонирования по HindIII: A.AGCTT	NTC/Invectys
3485-6967	трансен Ubi-hTERT	Invectys
6968-6973	сайт клонирования по XbaI: T.CTAGA	Invectys/NTC
6974-7120	вектор NTC8685-eRNA41H-HindIII-XbaI	NTC

Характеристики вектора: eRNA1 1а агониста RIG-I: 7-532, терминатор прокариот trpA: 535-564, РНК₁ аденовируса VA серотипа 5 (VA1): 568-761, удлинённый ориджин репликации, содержащий сайт сборки примосом (PAS-BH): 771-1055, ориджин репликации pUC: 1056-2070, маркер для отбора на сахарозе (RNA-OUT): 2087-2231, энхансер SV40: 2232-2451, энхансер CMV: 2452-2897, промотор CMV: 2898-3017, нетранслируемый лидер (экзон 1): 3018-3204, HTLV-1R: 3089-3314, синтетический 3'-интрон на основе β-глобина кролика: 3323-3429, экзон 2 (сайты связывания белка SR по Kozak): 3430-3478, трансен Ubi-hTERT, включающий сайты клонирования по HindIII-XbaI (Invectys): 3479-6973, терминатор эукариот: 6980-7114.

Фиг. 1В. Гель для проверки INVAC-1.

Экспрессирующий вектор INVAC-1 проверяли путем рестрикционного картирования. Профиль соответствует ожидаемой рестрикционной карте:

дорожка 1: маркер длин Ladder 1 т.п.о.,
 дорожка 2: нерасщепленный INVAC-1,
 дорожка 3: INVAC-1, расщепленный BglII/NotI (полосы в 3496, 3262, 220, 142 п.н.),
 дорожка 4: INVAC-1, расщепленный NcoI (полосы в 4084, 3036 п.н.),
 дорожка 5: INVAC-1, расщепленный HindIII/XbaI (полосы в 3631, 3489 п.н.),

Фиг. 2А. hTERT, INVAC-1 и производные INVAC-1.

Схема выравнивания между hTERT дикого типа и модифицированными белками Ubi-hTERT, кодируемыми INVAC-1 и производными INVAC-1: pUTD10Not (сокращенно Δ10Not), pUTD10Cog (сокращенно Δ10Cog) и pUTD23Tun (сокращенно Δ23).

Характеристики последовательностей:

VDD: делеция аминокислот 867-869 в каталитическом сайте.

DGLLLLRL (SEQ ID NO: 19): дополнительная делеция аминокислот 860-867; перед делецией VDD.

FLLVTPH (SEQ ID NO: 20): дополнительная делеция аминокислот 869-876; после делеции VDD.

IRR: дополнительная делеция аминокислот 857-859; перед делецией DGLLLLRL VDD (SEQ ID NO: 21).

LTH: дополнительная делеция аминокислот 877-879; после делеции VDDFLLVTPH (SEQ ID NO: 22).

Ubi: последовательность убиквитина человека (аминокислоты 1-76).

V5: С-концевой тег V5 для удобного выявления белка.

Фиг. 2В. Гель для проверки производных INVAC-1.

Экспрессирующие векторы pUTD10Not, pUTD10Cog и pUTD23Tun (производные INVAC-1) проверяли путем рестрикционного картирования. Профили соответствуют ожидаемым рестрикционным картам:

дорожка M: маркер длин Ladder 1 т.п.о.,
 дорожка 1: pUTD10Cog (полосы в 5348, 3585 п.н.),
 дорожка 2: pUTD10Not (полосы в 5348, 3585 п.н.),
 дорожка 3: pUTD23Tun (полосы в 5348, 3546 п.н.).

Фиг. 3. Экспрессия hTERT дикого типа, INVAC-1 и производных INVAC-1 *in vitro* в различных клеточных линиях при оценке методом вестерн-блот.

Конструкции с hTERT дикого типа (pTRIP-CMV-hTERT), пустым вектором (pNTC8685-eRNA41H, каркас INVAC-1 без чужеродной кодирующей последовательности), INVAC-1 и производными INVAC-1 (pUTD10Not/ Δ 10Not, pUTD10Cog/ Δ 10Cog и pUTD23Tyn/ Δ 23) трансфицировали в клетки HEK293T (A, C). В клетки CrFK трансфицировали конструкции с hTERT дикого типа, пустым вектором pNTC8685-eRNA41H и INVAC-1 (B).

Экспрессию белка отслеживали в течение 18-96 ч после трансфекции в клетках HEK293T (A, C) и в течение 24-72 ч в клетках CrFK (B).

Время сбора клеток указано над каждой дорожкой. На дорожки наносили по 15 мкг общего белка из клеточных лизатов для мембран A, B, C (hTERT, INVAC-1) и 20 мкг общего белка лизатов для мембран C (Δ 10Not, Δ 10Cog, Δ 23). hTERT выявляли с помощью моноклонального антитела кролика против hTERT (hTERT, INVAC-1) или против тега V5 (Δ 10Not, Δ 10Cog, Δ 23). В качестве контроля на нанесение использовали белок β -актина, который выявляли с помощью моноклонального антитела мыши против β -актина. Выявление белков hTERT из клеток CrFK (B) и белков производных INVAC-1 из клеток HEK293T (C) требовало более длительного времени экспозиции.

Фиг. 4. Внутриклеточная локализация hTERT и конструкций INVAC-1 в различных линиях клеток при оценке методом иммунофлуоресценции

Конструкции с hTERT дикого типа (pTRIP-CMV-hTERT), пустым вектором (pNTC8685-eRNA41H, каркас INVAC-1 без чужеродной кодирующей последовательности) и INVAC-1 трансфицировали в клетки HEK293T (A) или CrFK (D) в течение 24 ч и в клетки HeLa (B) или QT6 (C) в течение 24 и 48 ч.

Для иммунофлуоресцентного окрашивания клетки обрабатывали моноклональным антителом кролика против hTERT и вторичным козым антителом против кролика с Alexa Fluor 488® (зеленый). Ядра окрашивали с помощью DAPI (синий). Необработанные клетки окрашивали только DAPI. Клетки анализировали методом флуоресцентной микроскопии ($\times 63$).

Фиг. 5. Теломеразная активность hTERT, INVAC-1 и производных INVAC-1 при оценке методом TRAP.

Клетки CrFK трансфицировали конструкциями с hTERT дикого типа (pTRIP-CMV-hTERT), INVAC-1 и производными INVAC-1. Через 24 ч клетки собирали, экстрагировали общие клеточные белки и определяли теломеразную активность (обратную транскриптазу) по методу протокола амплификации теломерных повторов (TRAP). Представлены значения поглощения (OD при 450/690 нм) и относительной теломеразной активности (RTA; соотношение образец/положительный контроль) у конструкций с INVAC-1 (A, B) и производными INVAC-1 (C, D) по сравнению с hTERT дикого типа и необработанными клетками CrFK ($n=3$ для образцов с общей концентрацией белка 2,1 мкг), ** $p=0,0016$, *** $p<0,0001$, непарный t-критерий).

Никакой теломеразной активности не обнаруживалось в клетках CrFK, трансфицированных INVAC-1 и производными INVAC-1.

Фиг. 6. Влияние электропорации для индуцирования значительных уровней hTERT-специфичных Т-клеток CD8, секретирующих интерферон- γ после интрадермального (ID) введения INVAC-1.

Самок 7-недельных мышей C57BL/6 иммунизировали ID (2-8 мышей на группу) с помощью 100 мкг INVAC-1 или 1 \times PBS. У половины животных непосредственно после иммунизации проводили электропорацию по каждому месту вакцинации. Через 14 дней после вакцинации у всех мышей извлекали селезенки. Выделяли спленоциты на фиколле и стимулировали их для анализа ELISpot на IFN- γ в трех повторах пулом из двух пептидов hTERT, приуроченных к H2^b MHC (p429, p660), в течение 19 ч. Пятна проявляли с помощью конъюгированного с биотином детектирующего антитела с последующим раствором стрептавидина-AP и субстрата BCIP/NBT. Результаты представлены в виде средней частоты hTERT-специфичных Т-клеток CD8, секретирующих IFN γ , на 200000 спленоцитов. Анализ по Краскел-Уоллису с критерием Данна для множественных сравнений: * $p<0,05$. EP = электропорация.

Фиг. 7. Оценка различных способов введения INVAC-1 для вакцинации с последующей электропорацией для индуцирования hTERT-специфичных Т-клеток CD8, секретирующих интерферон- γ

Трансгенных 7-10-недельных мышей HLA-B7 иммунизировали (A) интрадермально (ID) или подкожно (SC) (по 3-8 мышей на группу) и (B) интрадермально (ID) или внутримышечно (IM) (по 4-5 мышей на группу) с помощью 25 мкг INVAC-1 или 1 \times PBS. Всех животных непосредственно после иммунизации подвергали электропорации по каждому месту вакцинации. Через 14 дней после вакцинации у всех мышей извлекали селезенки (A) или брали периферическую кровь (B). Выделяли спленоциты или PBMCs на фиколле и стимулировали их для анализа ELISpot на IFN- γ в трех повторах пулом из трех пептидов hTERT, приуроченных к HLA-B7 MHC (p351, p1 123 и p277), в течение 19 ч. Пятна проявляли с помощью конъюгированного с биотином детектирующего антитела с последующим раствором стрептавидина-AP и субстрата BCIP/NBT. Результаты представлены в виде средней частоты hTERT-специфичных Т-клеток CD8, секретирующих IFN γ , на 200000 спленоцитов или PBMCs. Непараметрический тест Манна-Уитни: * $p<0,05$. Пунктирная линия произвольно установлена на уровне 10 hTERT-

специфичных Т-клеток CD8, секретирующих IFN γ , на 200000 спленоцитов в качестве порога отсечения, позволяющего определять восприимчивых животных.

Фиг. 8. Влияние дозы вакцины на реакцию hTERT-специфичных Т-клеток CD8 после однократной иммунизации INVAC-1 и электропорации.

Самок 7-недельных мышей C57BL/6 иммунизировали ID с помощью (А) 12,5, 25, 50 или 100 мкг INVAC-1 или 1 \times PBS (4-6 мышей на группу) либо (В) 100, 200, 400, 800 или 1200 мкг INVAC-1 или 1 \times PBS (3-5 мышей на группу). Непосредственно после иммунизации проводили электропорацию по каждому месту вакцинации. Через 14 дней после вакцинации у всех мышей извлекали селезенки. Выделяли спленоциты на фиколле и стимулировали их для анализа ELISpot на IFN- γ в трех повторах пулом из двух пептидов hTERT, приуроченных к H2^b MHC (p429, p660), в течение 19 ч. Пятна проявляли с помощью конъюгированного с биотином детектирующего антитела с последующим раствором стрептавидина-AP и субстрата BCIP/NBT. Результаты представлены в виде средней частоты hTERT-специфичных Т-клеток CD8, секретирующих IFN γ , на 200000 спленоцитов. Анализ Краскел-Уоллис с критерием Данна для множественных сравнений: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. Пунктирная линия произвольно установлена на уровне 10 пятен на 200000 спленоцитов, чтобы определять восприимчивых животных.

Фиг. 9. Влияние вакцинации в режиме прайм-буст с помощью INVAC-1 на hTERT-специфичные Т-клетки CD8, секретирующие интерферон- γ .

Трансгенных 7-10-недельных мышей HLA-B7 иммунизировали интрадермально (ID) (по 5 мышей на группу) с помощью 25 мкг INVAC-1. Всех животных сразу после иммунизации подвергали электропорации по каждому месту вакцинации. Через 21 день мыши получали повторную (буст) инъекцию по такой же процедуре. Брали периферическую кровь перед первой иммунизацией, через 7, 15 и 21 день после первой (прайм) и через 9, 16 и 22 дня после повторной (буст) вакцинации.

Выделяли PBMCs на фиколле и стимулировали их для анализа ELISpot на IFN- γ в трех повторах пулом из трех пептидов hTERT, приуроченных к HLA-B7 MHC (p351, p1 123 и p277), в течение 19 ч. Пятна проявляли с помощью конъюгированного с биотином детектирующего антитела с последующим раствором стрептавидина-AP и субстрата BCIP/NBT. Результаты представлены в виде средней частоты hTERT-специфичных Т-клеток CD8, секретирующих IFN γ , на 200000 PBMCs. Непараметрический тест Манна-Уитни: * $p < 0,05$. Пунктирная линия произвольно установлена на уровне 10 пятен на 200000 PBMCs, чтобы определять восприимчивых животных.

Фиг. 10. Оценка ID-вакцинации (однократная иммунизация против режима прайм-буст) с помощью INVAC-1, Δ 10Not, Δ 10Cog или Δ 23 с последующей электропорацией для индуцирования hTERT-специфичных Т-клеток CD8, секретирующих интерферон- γ .

А) Самок 7-недельных мышей C57BL/6 иммунизировали ID (по 4 мыши на группу) с помощью 100 мкг INVAC-1, Δ 10Not, Δ 10Cog или Δ 23 либо 1 \times PBS. Непосредственно после иммунизации проводили электропорацию по каждому месту вакцинации. Через 21 день после первой вакцинации половина мышей получала повторную (буст) инъекцию по такой же процедуре. Через 14 или через 10 дней после последней иммунизации соответственно извлекали селезенки у животных, получавших однократные инъекции или же в режиме прайм-буст. Выделяли спленоциты на фиколле и стимулировали их для анализа ELISpot на IFN- γ в трех повторах пулом из двух пептидов hTERT, приуроченных к H2^b MHC (p429, p660), в течение 19 ч. Пятна проявляли с помощью конъюгированного с биотином детектирующего антитела с последующим раствором стрептавидина-AP и субстрата BCIP/NBT. Результаты представлены в виде средней частоты hTERT-специфичных Т-клеток CD8, секретирующих IFN γ , на 200000 спленоцитов для животных, получавших однократную инъекцию (прайм, черные точки) либо в режиме прайм-буст (PB, белые точки). Непараметрический тест Манна-Уитни: * $p < 0,05$. Порог отсечения произвольно установлен на уровне 10 hTERT-специфичных Т-клеток CD8, секретирующих IFN γ , на 200000 спленоцитов (пунктирная линия), чтобы определять восприимчивых животных. PB = после буста.

В) Трансгенных 7-10-недельных мышей HLA-B7 иммунизировали интрадермально (ID) (по 5 мышей на группу) с помощью 100 мкг INVAC-1, Δ 10Not, Δ 10Cog или Δ 23 либо 1 \times PBS. Всех животных сразу после иммунизации подвергали электропорации по каждому месту вакцинации. Через 21 день после первой вакцинации мыши получали повторную (буст) инъекцию по такой же процедуре. Выделяли спленоциты на фиколле и стимулировали их для анализа ELISpot на IFN- γ в трех повторах пулом из трех пептидов hTERT, приуроченных к HLA-B7 MHC (p351, p1123 и p277), в течение 19 ч. Пятна проявляли с помощью конъюгированного с биотином детектирующего антитела с последующим раствором стрептавидина-AP и субстрата BCIP/NBT. Результаты представлены в виде средней частоты hTERT-специфичных Т-клеток CD8, секретирующих IFN γ , на 200000 спленоцитов или PBLs. Непараметрический тест Манна-Уитни: * $p < 0,05$. Порог отсечения произвольно установлен на уровне 10 пятен на 200000 спленоцитов с тем, чтобы определять частоту восприимчивых животных (пунктирная линия).

Фиг. 11. Ширина реакции hTERT-специфичных Т-клеток после ID иммунизации с последующей электропорацией: сравнение между конструкциями INVAC-1, pNTC-hTERT и pNTC-hTERT- Δ VDD.

Трансгенных 7-13-недельных мышей HLA-B7 иммунизировали интрадермально (ID) (по 6 мышей на группу) с помощью 25 мкг INVAC-1, hTERT Δ VDD (pNTC-hTERT- Δ VDD), hTERT (pNTC-hTERT) или пустого вектора NTC (pNTC8685-eRNA41H). Сразу после иммунизации 48 животных подвергали электропорации по каждому месту вакцинации. Через 21 день после первой вакцинации половина животных получала повторную (буст) инъекцию по такой же процедуре. Через 14 или через 10 дней после последней иммунизации, соответственно, извлекали селезенки у животных, получавших однократные инъекции или же в режиме прайм-буст.

Выделяли спленоциты на фиколле и стимулировали их для анализа ELISpot на IFN- γ в трех повторах комплектом из 269 очищенных пептидов hTERT (чистота >70%, GenScript), разделенным на 27 пулов по 9-10 перекрывающихся пептидов hTERT (15-мерные пептиды с перекрыванием по 11 аминокислотам) при стимуляции в течение ночи (19 ч). Пятна проявляли с помощью конъюгированного с биотином детектирующего антитела с последующим раствором стрептавидина-AP и субстрата BCIP/NBT.

Для каждой мыши рассчитывали среднее число пятен по трем повторам и согласно условиям стимуляции (среда или пул пептидов). Затем вычисляли частоту (F) hTERT-специфичных Т-клеток после вычитания среднего числа пятен в стимулированных средой лунках из среднего числа пятен в стимулированных пулом пептидов лунках. Отрицательные значения принимали за 0 для последующих анализов.

Такой анализ проводили по животным, получавшим однократную (А) вакцинацию или в режиме прайм-буст (В). (А и В) Для каждой вакцинированной группы (INVAC-1, hTERT Δ VDD, hTERT, NTC) рассчитывали среднюю (n=6) частоту (F) специфичных к теломеразе Т-клеток, секретирующих IFN γ , на 200000 спленоцитов по каждому условию стимуляции, получая по одному значению для каждого из 27 пулов. (С) Общая сумма средних частот (F) специфичных к теломеразе Т-клеток по 27 пулам (269 очищенных пептидов) после вакцинации с помощью INVAC-1, hTERT Δ VDD, hTERT или NTC. Статистический анализ проводили с помощью программного обеспечения Prism 5, используя непараметрический критерий Краскел-Уоллис с поправкой Данна. Значения $p < 0,05$ считались статистически значимыми.

Фиг. 12. Потенциал ID-вакцинации с помощью INVAC-1 и электропорации для получения специфичных цитотоксических Т-клеток CD8 и Т-клеток Th1-CD4.

А) Трансгенных 7-10-недельных мышей HLA-B7 иммунизировали интрадермально (ID) (по 5 мышей на группу) с помощью 25 мкг INVAC-1 или 1 \times PBS. Всех животных сразу после иммунизации подвергали электропорации по каждому месту вакцинации. Через 14 дней после инъекции сингенные спленоциты, обработанные индивидуальными пептидами hTERT, приуроченными к HLA-B7 МНС (p351 либо p1123), или же оставшиеся необработанными, метили сукцинимидиловым эфиром карбоксифлуоресцеин-диацетата (CFSE) в трех различных концентрациях: высокой = 1 мкМ (621), средней = 0,5 мкМ (987) и низкой = 0,1 мкМ (необработанные). Вакцинированным мышам вводили в/в одинаковое количество сильно, средне или слабо меченных CFSE клеток. Через 15-18 ч определяли исчезновение обработанных пептидами клеток в селезенке методом проточной цитометрии. Рассчитывали степень специфического лизиса, сравнивая соотношение обработанных и необработанных клеток у вакцинированных в сравнении с контрольными мышами. Данные представлены в виде процента специфического лизиса для каждой мыши по каждому пептиду в селезенке после вакцинации INVAC-1. Горизонтальными столбиками представлен средний процент лизиса по каждому пептиду и каждому способу иммунизации. Также представлены стандартные отклонения (n=10 индивидуальных животных на группу). Статистический анализ проводили с помощью программного обеспечения Prism 5, используя непараметрический критерий Краскел-Уоллис с поправкой Данна. Значения $p < 0,05$ считались статистически значимыми.

В и С) Трансгенных 7-10-недельных мышей HLA-A2/DR1 иммунизировали интрадермально (ID) (7-10 мышей на группу) с помощью 25 мкг INVAC-1 или 1 \times PBS. Всех животных сразу после иммунизации подвергали электропорации по каждому месту вакцинации. Через 14 дней после вакцинации у всех мышей извлекали селезенки.

Выделяли спленоциты на фиколле и В) половину из них стимулировали в трех повторах для анализа ELISpot на IFN- γ пулом из трех пептидов hTERT, приуроченных к HLA-DR1 МНС (p1029, p578 и p904), в течение 19 ч. Пятна проявляли с помощью конъюгированного с биотином детектирующего антитела с последующим раствором стрептавидина-AP и субстрата BCIP/NBT. Результаты представлены в виде средней частоты hTERT-специфичных Т-клеток CD4, секретирующих IFN γ , на 200000 спленоцитов. Непараметрический тест Манна-Уитни: $p < 0,001$.

С) Другую половину спленоцитов стимулировали 24 ч пулом из трех пептидов hTERT, приуроченных к HLA-DR1 МНС (p1029, p578 и p904). Выделяли супернатанты от стимулированных клеток и тестировали их методом СВА, чтобы определить концентрацию цитокинов Th1/Th2 и Th17, секретируемых hTERT-специфичными Т-клетками CD4. Результаты представлены в виде средних концентраций цитокинов в пг/мл. Анализ по Краскел-Уоллис с критерием Данна для множественных сравнений: * $p < 0,05$.

Фиг. 13. Влияние терапевтической или профилактической ID-вакцинации с помощью INVAC-1 с последующей электропорацией на сингенной модели опухолей у трансгенных мышей HLA-A2/DR1.

А) Трансгенных 5-10-недельных мышей HLA-A2/DR1 иммунизировали интрадермально (ID) (по 5 мышей на группу) с помощью 100 мкг INVAC-1 либо 1 \times PBS. Всех животных сразу после иммунизации

подвергали электропорации по каждому месту вакцинации. Через 21 день после первой вакцинации мыши получали повторную (буст) инъекцию по такой же процедуре. Через 1 месяц после буста мышам инокулировали подкожно (SC) 50000 опухолевых клеток Sarc-2 (фибросаркома мыши). Представлен средний объем опухолей в каждой вакцинированной группе в различные дни после прививания опухолевых клеток. Пунктирная линия установлена на уровне 500 мм^3 , чтобы рассчитать замедление роста опухолей.

В) Трансгенным 24-недельным мышам HLA-A2/DR1 (по 10 мышей на группу) инокулировали подкожно (SC) 20000 опухолевых клеток Sarc-2 (фибросаркома мыши). Через 4 дня после прививания опухолевых клеток животных иммунизировали интрадермально (ID) с помощью 25 мкг INVAC-1 либо пустой плазмидой (NTC, каркас INVAC-1 без последовательности антигена). Всех животных сразу после иммунизации подвергали электропорации по каждому месту вакцинации. Через 21 и 35 дней после первичной вакцинации мыши получали повторные (буст) инъекции по такой же процедуре. Представлен средний объем опухолей в каждой вакцинированной группе в различные дни после прививания опухолевых клеток. Пунктирная линия установлена на уровне 500 мм^3 , чтобы рассчитать замедление роста опухолей.

Фиг. 14. Усиление индуцированных INVAC-1 клеточных иммунных ответов под действием GM-CSF и эффективность *in vivo* на сингенной модели опухолей у трансгенных мышей HLA-A2/DR1

А) Самок 7-недельных мышей C57BL/6 иммунизировали ID (по 5 мышей на группу) с помощью 25 мкг INVAC-1, 25 мкг INVAC-1 и 0,5 мкг mGM-CSF или $1 \times \text{PBS}$. Сразу после иммунизации INVAC-1 проводили электропорацию по каждому месту вакцинации. Через 14 дней после вакцинации у всех мышей извлекали селезенки. Выделяли спленоциты на фиколле и стимулировали их для анализа ELISpot на $\text{IFN-}\gamma$ в трех повторах пулом из двух пептидов hTERT, приуроченных к H2^b MHC (p429, p660), в течение 19 ч. Пятна проявляли с помощью конъюгированного с биотином детектирующего антитела с последующим раствором стрептавидина-AP и субстрата BCIP/NBT. Результаты представлены в виде средней частоты hTERT-специфичных Т-клеток CD8, секретирующих $\text{IFN}\gamma$, на 200000 спленоцитов. Анализ по Краскел-Уоллис с критерием Данна для множественных сравнений: $**p < 0,01$.

В) Трансгенных 7-10-недельных мышей HLA-A2/DR1 иммунизировали интрадермально (ID) (по 5 мышей на группу) с помощью 100 мкг INVAC-1 либо 100 мкг INVAC-1 и 5 мкг GM-CSF. Всех животных сразу после иммунизации подвергали электропорации по каждому месту вакцинации. Через 14 дней после вакцинации у всех мышей извлекали селезенки. Выделяли спленоциты на фиколле и стимулировали их в трех повторах пулом из трех пептидов hTERT, приуроченных к HLA-DR1 MHC (p1029, p578 и p904), в течение 24 ч. Выделяли супернатанты от стимулированных клеток и тестировали их методом СВА, чтобы определить концентрацию цитокинов Th1/Th2 и Th17, секретируемых hTERT-специфичными Т-клетками CD4. Результаты представлены в виде средних концентраций цитокинов в пг/мл. Анализ по Краскел-Уоллис с критерием Данна для множественных сравнений: $*p < 0,05$, $**p < 0,01$.

С) Трансгенным 7-10-недельным мышам HLA-A2/DR1 (по 10 мышей на группу) инокулировали подкожно (SC) 20000 опухолевых клеток Sarc-2 (фибросаркома мыши). Через 4 дня после прививания опухолевых клеток животных иммунизировали интрадермально (ID) с помощью 25 мкг INVAC-1 и 0,5 мкг mGM-CSF, пустой плазмидой (NTC, каркас INVAC-1 без последовательности антигена) и 0,5 мкг mGM-CSF или $1 \times \text{PBS}$ и 0,5 мкг mGM-CSF. Всех животных сразу после иммунизации INVAC-1 подвергали электропорации по каждому месту вакцинации. Через 21 и 35 дней после первичной вакцинации мыши получали повторные (буст) инъекции по такой же процедуре. Представлен средний объем опухолей в каждой вакцинированной группе в различные дни после прививания опухолевых клеток. Пунктирная линия установлена на уровне 500 мм^3 , чтобы рассчитать замедление роста опухолей.

Фиг. 15. Влияние IL-12 - усиление индуцированных INVAC-1 ответов hTERT-специфичных Т-клеток CD8.

Трансгенных 7-10-недельных мышей HLA-A2/DR1 иммунизировали интрадермально (ID) (по 5 мышей на группу) с помощью 100 мкг INVAC-1, 100 мкг INVAC-1 и 1 нг IL-12, $1 \times \text{PBS}$ или $1 \times \text{PBS}$ и 1 нг IL-12. Всех животных сразу после иммунизации INVAC-1 подвергали электропорации по каждому месту вакцинации. Через 14 дней после вакцинации у всех мышей извлекали селезенки. Выделяли спленоциты на фиколле и стимулировали их в трех повторах для анализа ELISpot на $\text{IFN-}\gamma$ пулом из двух пептидов hTERT, приуроченных к HLA-A2 (UCP4.1 и UCP2.1), в течение 19 ч. Пятна проявляли с помощью конъюгированного с биотином детектирующего антитела с последующим раствором стрептавидина-AP и субстрата BCIP/NBT. Результаты представлены в виде средней частоты hTERT-специфичных Т-клеток CD8, секретирующих $\text{IFN}\gamma$, на 200000 спленоцитов. Пунктирная линия установлена на уровне 10 пятен на 200000 спленоцитов, чтобы определять восприимчивых животных.

На фиг. 16 представлена полная нуклеотидная последовательность экспрессирующего вектора - плазмиды INVAC-1 (7120 п.н.). Характеристики вектора приведены в подписи к фиг. 1А. Кодированный INVAC-1 слитый белок hTERT (1158 а.к.) начинается в положении 3488 (ATG, кодирующий аминокислоту М) и заканчивается в положении 6961 (GAC, кодирующий аминокислоту D). Из белка INVAC-1/hTERT удалены первые 47 аминокислот (а.к. 1-47), которые заменены полипептидом убикви-

тина (76 а.к.). Каталитический сайт инактивирован делецией 9 п.н. (между нуклеотидами 6172-6173), кодирующих VDD (* в последовательности) и соответствующих а.к. 867-869 теломеразы дикого типа человека (hTERT; номер доступа NM_198253). Первая строка - нуклеотидная последовательность; вторая строка - соответствующая аминокислотная последовательность. Аннотации (также см. фиг. 1А) приведены над или под последовательностями. "□": стоп-кодон.

На фиг. 17 представлена последовательность вставки, кодирующей слитый белок D10Not убиквитин-теломеразы человека (Ubi-hTERT). Из hTERT удалены первые 23 аминокислоты (а.к. 1-23), которые заменены полипептидом убиквитина (76 а.к.). Введена дополнительная делеция между аминокислотами 912-913 (* см. последовательность), соответствующими а.к. 860-869 теломеразы дикого типа человека (hTERT; номер доступа NM_198253). Эта делеция 10 аминокислот включает в себя делецию 3 а.к. (AVDD), что приводит к инактивации энзиматической активности TERT человека, и делецию еще 7 а.к. перед последовательностью VDD. 14 аминокислот в С-концевой последовательности Ubi-hTERT кодируют эпитопный тег V5. Первая строка - нуклеотидная последовательность; вторая строка - соответствующая аминокислотная последовательность. Аннотации приведены над или под последовательностями "□": стоп-кодон.

На фиг. 18 представлена последовательность вставки, кодирующей слитый белок D10Cог убиквитин-теломеразы человека (Ubi-hTERT). Из hTERT удалены первые 23 аминокислоты (а.к. 1-23), которые заменены полипептидом убиквитина (76 а.к.). Введена дополнительная делеция между аминокислотами 919-920 (* см. последовательность), соответствующими а.к. 867-876 теломеразы дикого типа человека (hTERT; номер доступа NM_198253). Эта делеция 10 аминокислот включает в себя делецию 3 а.к. (AVDD), что приводит к инактивации энзиматической активности TERT человека, и делецию еще 7 а.к. после последовательности VDD. 14 аминокислот в С-концевой последовательности Ubi-hTERT кодируют эпитопный тег V5. Первая строка - нуклеотидная последовательность; вторая строка - соответствующая аминокислотная последовательность. Аннотации приведены над или под последовательностями. "□": стоп-кодон.

На фиг. 19 представлена последовательность вставки, кодирующей слитый белок D23Tуп убиквитин-теломеразы человека (Ubi-hTERT). Из hTERT удалены первые 23 аминокислоты (а.к. 1-23), которые заменены полипептидом убиквитина (76 а.к.). Введена дополнительная делеция между аминокислотами 909-910 (* см. последовательность), соответствующими а.к. 857-879 теломеразы дикого типа человека (hTERT; номер доступа NM_198253). Эта делеция 23 аминокислот включает в себя делецию 3 а.к. (ΔVDD), что приводит к инактивации энзиматической активности TERT человека, и делецию дополнительных 10 а.к. перед последовательностью VDD и после неё. 14 аминокислот в С-концевой последовательности Ubi-hTERT кодируют эпитопный тег V5. Первая строка - нуклеотидная последовательность; вторая строка - соответствующая аминокислотная последовательность. Аннотации приведены над или под последовательностями. "□": стоп-кодон.

Фиг. 20. Карты перетасованных производных плазмиды INVAC-1.

Расположение (нуклеотиды)	Последовательность	Источник
1-882	вектор pcDNA™3.1 (+)	каркас коммерческого вектора от Invitrogen, используемый фирмой GeneCust
883-922	сайт множественного клонирования (MCS), содержащий сайт клонирования по HindIII: A.AGCTT	Invitrogen
923-4474	перетасованные трансгены Ubi-hTERT	Invectys
4475-4517	сайт множественного клонирования (MCS), содержащий сайт клонирования по XbaI: T.CTAGA	Invitrogen
4518-8918	вектор pcDNA™3.1 (+)	каркас коммерческого вектора от Invitrogen, используемый фирмой GeneCust

Фиг. 20А. рUTScram: характеристики вектора.

Ген	Расположение (нуклеотиды)
Промотор CMV	232-819
Промотор T7	863-882
hUbi (убиквитин человека)	923-1150
Линкер 4xGly	1151-1162
Перетасованный hTERT (перетасованный TERT человека)	1163-4414
Фрагмент 7 hTERT	1163-1372
Линкер 6xGly	1373-1390
Фрагмент 2 hTERT	1391-1591
Линкер 6xGly	1592-1609
Фрагмент 6 hTERT	1610-1921
Линкер 6xGly	1922-1939
Фрагмент 4 hTERT	1940-2056
Линкер 6xGly	2057-2074
Фрагмент 9 hTERT	2075-2650
Линкер 6xGly	2651-2668
Фрагмент 3 hTERT	2669-2788
Линкер 6xGly	2789-2806
Фрагмент 1 hTERT	2807-3064
Линкер 6xGly	3065-3082
Фрагмент 8 hTERT	3083-3559
Линкер 6xGly	3560-3577
Фрагмент 10 hTERT	3578-4093
Линкер 6xGly	4094-4111
Фрагмент 5 hTERT	4112-4414
Линкер 6xGly	4415-4432
Ter V5	4433-4474
Последовательность полиаденилирования BGH	4518-4742
Ori f1 (ориджин репликации f1)	4788-5216
Ранний промотор и ориджин репликации SV40	5221-5564
Ген неомицина	5626-6420
pA SV40 (ранний сигнал полиаденилирования SV40)	6594-6724
Ориджин репликации pUC (комплементарная цепь)	7107-7777
Ген ампициллина (комплементарная цепь)	7922-8782

Фиг. 20В. pUTInv: характеристики вектора.

Ген	Расположение (нуклеотиды)
Промотор CMV	232-819
Промотор T7	863-882
hUbi (убиквитин человека)	923-1150
Линкер 4xGly	1151-1162
Инвертированный hTERT (инвертированный TERT человека)	1163-4414
Фрагмент 10 hTERT	1163-1678
Линкер 6xGly	1679-1696
Фрагмент 9 hTERT	1697-2272
Линкер 6xGly	2273-2290
Фрагмент 8 hTERT	2291-2767
Линкер 6xGly	2768-2785
Фрагмент 7 hTERT	2786-2995
Линкер 6xGly	2996-3013
Фрагмент 6 hTERT	3014-3325
Линкер 6xGly	3326-3343
Фрагмент 5 hTERT	3344-3646
Линкер 6xGly	3647-3664
Фрагмент 4 hTERT	3665-3781
Линкер 6xGly	3782-3799
Фрагмент 3 hTERT	3800-3919
Линкер 6xGly	3920-3937
Фрагмент 2 hTERT	3938-4138
Линкер 6xGly	4139-4156
Фрагмент 1 hTERT	4157-4414
Линкер 6xGly	4415-4432
Тег V5	4433-4474
Последовательность полиаденилирования BGH	4518-4742
Ори f1 (ориджин репликации f1)	4788-5216
Ранний промотор и ориджин репликации SV40	5221-5564
Ген неомицина	5626-6420
pA SV40 (ранний сигнал полиаденилирования SV40)	6594-6724
Ориджин репликации pUC (комплементарная цепь)	7107-7777
Ген ампициллина (комплементарная цепь)	7922-8782

Фиг. 21А. Гель для проверки pUTScram.

Экспрессирующий вектор pUTScram проверяли путем рестрикционного картирования. Профиль соответствует ожидаемой рестрикционной карте:

дорожка М: маркер длин Ladder 1 т.п.о.,

дорожка 1: pUTScram, расщепленный HindIII/XbaI (полосы в 3576, 5342 п.н.).

Фиг. 21В. Гель для проверки pUTInv.

Экспрессирующий вектор pUTInv проверяли путем рестрикционного картирования. Профиль соответствует ожидаемой рестрикционной карте:

дорожка М: маркер длин Ladder 1 т.п.о.,

дорожка 1: pUTInv, расщепленный HindIII/XbaI (полосы в 3576, 5342 п.н.).

Фиг. 22. Конструкции hTERT, INVAC-1, pUTScram и pUTInv.

Схема выравнивания между hTERT дикого типа и модифицированными белками Ubi-hTERT, кодируемыми INVAC-1 и перетасованными производными INVAC-1: pUTScram (перетасованный) и pUTInv (инвертированный).

Модифицированная последовательность hTERT (Δ VDD) была разделена на десять иммуногенных фрагментов:

фрагмент 1 (258 п.н., Leu24-Gly109),

фрагмент 2 (201 п.н., Phe115-Ala181),

фрагмент 3 (120 п.н., Trp203-Ala242),

фрагмент 4 (117 п.н., Ser255-Arg293),

фрагмент 5 (303 п.н., Pro320-Thr420),

фрагмент 6 (312 п.н., Ala423-Val526),

фрагмент 7 (210 п.н., Cys528-Gln597),

фрагмент 8 (477 п.н., Arg599-Lys757),

фрагмент 9 (576 п.н., Lys760-Ile951)

фрагмент 10 (516 п.н., Asn958-Asp1129).

Характеристики последовательностей:

VDD: делеция аминокислот 867-869 в каталитическом сайте,

Ubi: последовательность убиквитина человека (аминокислоты 1-76),

F (Phe): остаток фенилаланина hTERT (а.к. 47),

G (Gly): С-концевой остаток глицина убиквитина (а.к. 76),

R (Arg): аргинин, первая аминокислота белка INVAC-1 (а.к. 77),

N (Asn): аспарагин, первая аминокислота искусственного белка hTERT (перетасованного), кодируемого pUTScram (а.к. 81),

C (Cys): цистеин, первая аминокислота искусственного белка hTERT (инвертированного), кодируемого pUTInv (а.к. 81)

V5: С-концевой тег V5 для удобного выявления белка.

Фиг. 23. Экспрессия *in vitro* hTERT дикого типа, INVAC-1 и перетасованных производных INVAC-1 при оценке методом вестерн-блот.

Трансфецировали hTERT дикого типа, INVAC-1, pUTScram и pUTInv в клетки HEK293T. Отслеживали экспрессию белка в течение 18-96 ч после трансфекции. (А и С) Наносили образцы hTERT дикого типа и INVAC-1 для 18 ч и 72 ч по 15 мкг общей концентрации белка. Эти образцы служили в качестве положительного контроля на экспрессию белков. (А) Перетасованный и (С) инвертированный белки наносили по 20 мкг общего белка из лизатов клеток на 1 дорожку. hTERT выявляли с помощью моноклонального антитела кролика против hTERT (hTERT, INVAC-1) или мышинового моноклонального антитела против тега V5 (перетасованный, инвертированный). Время сбора клеток указано над каждой дорожкой. В качестве контроля на нанесение использовали белок бета-актина, который детектировали с помощью мышинового моноклонального антитела против бета-актина. Для обнаружения перетасованных производных продуктов INVAC-1 требуется более длительное время экспозиции, чем для белков hTERT дикого типа и INVAC-1 (от 10 с до 30 мин в сравнении с менее 1 с).

Интенсивность сигналов перетасованных белков на вестерн-блоте нормализовали по сигналу бета-актина (А и С) с помощью программного обеспечения ImageJ. (В) Перетасованный. (D) Инвертированный. Для каждой дорожки строили графики профилей контроля на нанесение и белковых полос, получая условные числа, соответствующие площади под кривой профиля. Рассчитывали соотношения (относительные плотности) путем деления значений площади для каждого образца на значение площади для соответствующего контроля на нанесение.

Фиг. 24. Теломеразные активности hTERT, INVAC-1 и перетасованных производных INVAC-1 при оценке методом TRAP.

Клетки CrFK трансфецировали конструкциями hTERT дикого типа (pTRIP-CMV-hTERT), pUTScram и pUTInv. Через 24 ч собирали клетки, выделяли общий белок из клеток и определяли теломеразную активность (обратную транскриптазу) по методу протокола амплификации теломерных повторов (TRAP). Представлены значения поглощения (OD при 450/690 нм) и относительной теломеразной активности (RTA; соотношение образец/положительный контроль) у перетасованных конструкций (А и В, соответственно) по сравнению с hTERT дикого типа и необработанными клетками CrFK (n=3 для образцов с общей концентрацией белка 2,1 мкг), непарный t-критерий.

Никакой теломеразной активности не обнаруживалось в клетках CrFK, трансфецированных конструкциями pUTScram и pUTInv.

Фиг. 25. Оценка вакцинации с помощью INVAC-1, pUTScram и pUTInv с последующей электропорацией для индуцирования hTERT-специфичных Т-клеток CD8, секретирующих интерферон- γ .

Трансгенных 9-15-недельных мышей HLA-B7 иммунизировали интрадермально (ID) (по 3-5 мышей на группу) с помощью 100 мкг INVAC-1, pUTScram, pUTInv или 1×PBS при двух циклах иммунизации (в режиме прайм-буст). Непосредственно после каждой иммунизации проводили электропорацию по каждому месту вакцинации. Через 10 дней после второй иммунизации у мышей извлекали селезенки.

Выделяли спленоциты на фиколле и стимулировали их для анализа ELISpot на IFN- γ в трех повторах пулом из трех пептидов hTERT, приуроченных к HLA-B7 MHC (p277, p351 и p1123), или чистой средой, в течение 19 ч. Пятна проявляли с помощью конъюгированного с биотином детектирующего антитела с последующим раствором стрептавидина-AP и субстрата BCIP/NBT. Результаты представлены в виде средней частоты hTERT-специфичных Т-клеток CD8, секретирующих IFN γ , на 200000 спленоцитов. Непараметрический тест Манна-Уитни: *p<0,05. Порог отсека произвольно установлен на уровне 10 пятен на 200000 спленоцитов, чтобы определять частоту восприимчивых животных (пунктирная линия).

Фиг. 26. Потенциал pUTScram и pUTInv для получения hTERT-специфичных цитотоксических Т-клеток CD8 после ID-вакцинации и электропорации.

Трансгенных 15-недельных мышей HLA-B7 иммунизировали интрадермально (ID) (по 4-6 мышей на группу) с помощью 100 мкг INVAC-1, pUTScram, pUTInv или 1×PBS. Всех животных сразу после иммунизации подвергали электропорации по каждому месту вакцинации. Через 14 дней после инъекции сингенные спленоциты, обработанные индивидуальными пептидами hTERT, приуроченными к HLA-B7

МНС (p351 либо p1123), или же оставшиеся необработанными, метили сукцинимидиловым эфиром карбоксифлуоресцеин-диацетата (CFSE) в трех различных концентрациях: высокая = 5 мкМ (351), средняя = 2 мкМ (1123) и низкая = 0,2 мкМ (необработанные). Вакцинированным мышам вводили смесь, содержащую одинаковое количество меченных CFSE клеток из каждой концентрации, через ретроорбитальную вену (IV). Через 15-18 ч определяли исчезновение обработанных пептидами клеток в селезенке методом проточной цитометрии. Рассчитывали степень специфического лизиса, сравнивая соотношение обработанных и необработанных клеток у вакцинированных в сравнении с контрольными мышами. Данные представлены в виде процента специфического лизиса для каждой мыши по каждому отдельному пептиду в селезенке после ID-вакцинации. Горизонтальными столбиками представлен средний процент лизиса по каждому пептиду. Статистический анализ проводили с помощью программного обеспечения Prism 5, используя непараметрический критерий Краскел-Уоллис с поправкой Данна. Значения $p < 0,05$ считались статистически значимыми.

На фиг. 27 представлено разграничение иммуногенных сегментов оптимизированной по кодам последовательности Ubi-hTERT, используемой для конструирования перетасованных производных IN-VAC-1. Первая строка - оптимизированная по кодам нуклеотидная последовательность Ubi-hTERT (SEQ ID NO: 45), а вторая строка - соответствующая аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 46). Последовательность Ubi-hTERT разделена на 10 фрагментов, которые включают иммуногенные последовательности. Эти фрагменты разграничены символами (< ... >). Иммуногенные последовательности выделены серым цветом. Подчеркнуты неиммуногенные последовательности между фрагментами hTERT, которые не включены в конструкции pUTScram и pUTInv. 14 аминокислот в С-концевой последовательности Ubi-hTERT кодируют эпитопный тег V5. Аннотации приведены над или под последовательностями. (*) означает делецию последовательности VDD. "□": стоп-кодон.

На фиг. 28 представлена полная нуклеотидная последовательность вставки pUTScram (3555 п.н.). Характеристики вектора приведены в подписи к фиг. 20.

Перетасованная вставка Ubi-hTERT (перетасованный, 1184 а.к.) начинается в положении 923 (ATG, кодирующий аминокислоту М) и заканчивается в положении 4474 (ACT, кодирующий аминокислоту Т) pUTScram. Из белка hTERT удалены первые 23 аминокислоты (а.к. 1-23), которые заменены полипептидом убиквитина (76 а.к.). Каталитический сайт инактивирован делецией 9 п.н., кодирующих VDD (* в последовательности) и соответствующих а.к. 867-869 теломеразы дикого типа человека (hTERT, патент WO 2007/014740; и изоформа 1 hTERT, номер доступа NM_198253). Последовательность hTERT разделена на 10 иммуногенных фрагментов и вновь собрана в следующем определенном порядке:

фрагмент 7 (210 п.н.),
фрагмент 2 (201 п.н.),
фрагмент 6 (312 п.н.),
фрагмент 4 (117 п.н.),
фрагмент 9 (576 п.н.),
фрагмент 3 (120 п.н.),
фрагмент 1 (258 п.н.),
фрагмент 8 (477 п.н.),
фрагмент 10 (516 п.н.),
фрагмент 5 (303 п.н.).

Эти 10 фрагментов соединяются линкером 6xGly (G-линкер; 18 п.н.). 14 аминокислот в С-концевой последовательности перетасованной вставки Ubi-hTERT кодируют эпитопный тег V5. Первая строка - нуклеотидная последовательность (SEQ ID NO: 47), вторая строка - соответствующая аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 48). Аннотации (также см. фиг. 20А) приведены над или под последовательностями. "□": стоп-кодон.

На фиг. 29 представлена полная нуклеотидная последовательность вставки pUTInv (3555 п.н.). Характеристики вектора приведены в подписи к фиг. 20. Инвертированная вставка Ubi-hTERT (инвертированный, 1184 а.к.) начинается в положении 923 (ATG, кодирующий аминокислоту М) и заканчивается в положении 4474 (ACT, кодирующий аминокислоту Т) pUTInv. Из белка hTERT удалены первые 23 аминокислоты (а.к. 1-23), которые заменены полипептидом убиквитина (76 а.к.). Каталитический сайт инактивирован делецией 9 п.н., кодирующих VDD (* в последовательности) и соответствующих а.к. 867-869 теломеразы дикого типа человека (hTERT, патент WO 2007/014740, номер доступа NM_198253). Последовательность hTERT разделена на 10 иммуногенных фрагментов и вновь собрана в следующем определенном порядке:

фрагмент 10 (516 п.н.),
фрагмент 9 (576 п.н.),
фрагмент 8 (477 п.н.),
фрагмент 7 (210 п.н.),
фрагмент 6 (312 п.н.),
фрагмент 5 (303 п.н.),

фрагмент 4 (117 п.н.),
фрагмент 3 (120 п.н.),
фрагмент 2 (201 п.н.),
фрагмент 1 (258 п.н.).

Эти 10 фрагментов соединяются линкером 6xGly (G-линкер; 18 п.н.). 14 аминокислот в С-концевой последовательности перетасованной вставки Ubi-hTERT кодируют эпитопный тег V5. Первая строка - нуклеотидная последовательность (SEQ ID NO: 49), вторая строка - соответствующая аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 50). Аннотации (также см. фиг. 20B) приведены над или под последовательностями. "□": стоп-кодон.

Раскрытие сущности изобретения

Определения.

Теломеразный комплекс состоит из матрицы РНК и белковых компонентов, в том числе обратной транскриптазы, обозначаемой как "обратная транскриптаза теломеразы" (TERT), которая является основной детерминантой активности теломеразы. Если не указано иначе, в настоящем описании термин "теломераза" относится к TERT, включая теломеразу дикого типа человека, или к её вариантам. Теломераза дикого типа человека (или hTERT) известна (номер доступа в GeneBank: NM_198253) и имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 (её кДНК приведена в виде SEQ ID NO: 1).

"Каталитическая активность теломеразы" относится к активности TERT в качестве обратной транскриптазы теломеразы. Термин "лишенная каталитической активности теломеразы" означает, что последовательность нуклеиновой кислоты кодирует мутантную TERT, которая является неактивной.

В настоящем изобретении термин "вариант" относится к аллельным вариантам, сплайс-вариантам, естественным или искусственным мутантам, которые гомологичны стандартной последовательности hTERT. Две аминокислотные последовательности являются "гомологичными", "существенно гомологичными" или "существенно сходными", если один или несколько аминокислотных остатков заменены биологически сходными остатками или когда более 80% аминокислот являются идентичными или же более 90%, а предпочтительно более 95% являются аналогичными (функционально идентичными). Предпочтительно аналогичные или гомологичные последовательности идентифицируются путем выравнивания с использованием, к примеру, пакета программ GCG (Genetics Computer Group, Program Manual for the GCG Package, Version 7, Madison, Wisconsin) или любой из программ, известных в данной области (BLAST, FASTA и т.п.).

К "замещенным" или "модифицированным" в настоящем изобретении относятся такие аминокислоты, которые были изменены или модифицированы по сравнению со встречающимися в природе аминокислотами.

К вариантам относятся белки, у которых последовательность отличается от белка hTERT дикого типа одной или несколькими мутациями (т.е. заменами, делециями, вставками), более предпочтительно одной или несколькими точечными заменами. Варианты могут содержать консервативные замены.

Термин "консервативная замена" в настоящем изобретении обозначает замену одного аминокислотного остатка другим, без изменения общей конформации и функции пептида, включая, без ограничения, замены одних аминокислот другими с близкими свойствами (такими, к примеру, как полярность, способность к образованию водородных связей, кислотность, основность, форма, гидрофобность, ароматичность и т.п.). Аминокислоты с близкими свойствами хорошо известны в данной области. Например, аргинин, гистидин и лизин являются гидрофильными основными аминокислотами и могут заменять друг друга. Точно так же изолейцин, гидрофобная аминокислота, может быть заменен на лейцин, метионин или валин. Нейтральные гидрофильные аминокислоты, которые могут заменять друг друга, включают аспарагин, глутамин, серин и треонин.

Термин "выделенный полинуклеотид" определяется как полинуклеотид, который извлечен из того окружения, в котором он встречается в природе. Например, встречающаяся в природе молекула ДНК, находящаяся в геноме живой бактерии или в составе банка генов, не является выделенной, но та же молекула, отделенная от остальной части бактериального генома в результате, например, события клонирования (амплификации), является выделенной. Как правило, выделенная молекула ДНК лишена тех участков ДНК (например, кодирующих участков), с которыми она непосредственно соприкасается на 5'- или 3'-конце в природном геноме. Такие выделенные полинуклеотиды могут быть частью вектора или композиции и все-таки будут определяться как выделенные, поскольку такой вектор или композиция не является частью естественного окружения данного полинуклеотида.

Термин "иммуногенная" означает, что композиция или конструкция, к которой он относится, способна индуцировать иммунный ответ при введении. "Иммунный ответ" у субъекта означает возникновение врожденного и адаптивного иммунитета, включая гуморальный иммунитет, клеточный иммунитет либо гуморальный и клеточный иммунитет к антигену. "Гуморальный иммунитет" означает такой иммунитет, который опосредуется антителами. "Клеточный иммунитет" опосредуется Т-лимфоцитами. Он включает продукцию цитокинов, хемокинов и других подобных молекул, которые вырабатываются активированными Т-клетками, лейкоцитами или теми и другими. Иммунные реакции могут быть определены с помощью стандартных методов иммуноанализа и нейтрализации для выявления тех гуморальных

иммунных ответов, которые известны в данной области.

В контексте изобретения иммунный ответ предпочтительно охватывает стимуляцию или пролиферацию цитотоксических Т-клеток CD8 и/или Т-клеток CD4 и может быть определен с помощью таких методов иммуноанализа, как метод ELISpot, анализ цитотоксичности *in vivo* или анализ секреции и связывания цитокинов.

В настоящем изобретении термин "лечение" или "терапия" или "иммунотерапия" означает что-либо типа облегчения, ослабления и/или устранения, уменьшения и/или стабилизации (например, отсутствия прогрессирования до более запущенных стадий) симптомов, а также замедления развития опухоли или дисплазии либо их симптомов. Таким образом, термин включает в себя достижение эффективного иммунного ответа против опухолей, наблюдающихся у больных раком.

В настоящем изобретении термин "профилактика" или "предотвращение" означает облегчение, ослабление и/или устранение, уменьшение и/или стабилизацию (например, отсутствие прогрессирования до более запущенных стадий) продромов, т.е. любых изменений или ранних симптомов (или целого комплекса симптомов), которые могли бы указывать на начало заболевания прежде, чем возникнут конкретные симптомы.

Клетки, "гиперэкспрессирующие теломеразу", означают такие клетки у субъекта, которые либо экспрессируют теломеразу, например, при мутации или инфекции, особенно при инфекции, вызванной онковирусом, тогда как это обычно не происходит в нормальных условиях, либо такие клетки у субъекта, которые экспрессируют теломеразу на более высоком уровне (например, при мутации или инфекции), чем при нормальных условиях. Предпочтительно клетки, гиперэкспрессирующие теломеразу, проявляют повышение экспрессии по меньшей мере на 5%, по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80% или больше.

"Пациентами" или "субъектами", как правило, являются млекопитающие, предпочтительно люди, любого возраста, пола или тяжести заболевания.

Нуклеиново-кислотные конструкции.

Настоящим предусмотрены нуклеиново-кислотные конструкции, которые предназначены для вакцинации пациентов. Нуклеиново-кислотные конструкции кодируют теломеразы, которые лишены каталитической активности теломеразы (что устраняет их иммортализирующее действие) и лишены сигнала ядрышковой локализации (что предотвращает их переход в ядрышко).

Нуклеиново-кислотные конструкции по изобретению находятся в выделенном виде.

Нуклеиновая кислота может представлять собой ДНК или РНК, но предпочтительно это ДНК, еще более предпочтительно двухцепочечная ДНК.

Нуклеиново-кислотные конструкции не являются встречающимися в природе геномными нуклеиновыми кислотами, в частности, они не содержат интронов.

В качестве первой меры безопасности последовательность hTERT лишена каталитической активности теломеразы. В предпочтительном воплощении последовательность, кодирующая hTERT, содержит мутации, которые обеспечивают инактивацию каталитической активности белка hTERT. Термин "мутация" включает в себя замены одной или нескольких аминокислот, делеции одной или нескольких аминокислот и/или вставки одной или нескольких аминокислот. В предпочтительном воплощении белок hTERT лишен каталитической активности теломеразы посредством делеции по меньшей мере одной аминокислоты.

Предпочтительно последовательность имеет делецию, предпочтительно делецию аминокислот VDD, как показано на фиг. 2А. Предпочтительно белок hTERT лишен каталитической активности теломеразы посредством единственной делеции аминокислот 867-869 (VDD). В другом предпочтительном воплощении белок hTERT лишен каталитической активности теломеразы посредством дальнейшего удаления от 1 до 10, 11 или 12 аминокислот перед и/или после аминокислот 867-869 (VDD).

В качестве второй меры безопасности последовательность, кодирующая hTERT, также лишена сигнала ядрышковой локализации. Этот сигнал ядрышковой локализации коррелирует с субклеточной локализацией hTERT и тем самым с её ферментативной активностью. Предпочтительно белок hTERT лишен сигнала ядрышковой локализации посредством делеции по крайней мере аминокислот 1-23, еще более предпочтительно посредством делеции аминокислот 1-47.

Наряду с модификациями, обеспечивающими первую и вторую меры безопасности, белок hTERT, кодируемый конструкцией из нуклеиновой кислоты по изобретению, может представлять собой последовательность hTERT дикого типа или вариант такой последовательности.

В перечне последовательностей:

SEQ ID NO: 1 - кДНК hTERT дикого типа;

SEQ ID NO: 2 - соответствующая аминокислотная последовательность;

SEQ ID NO: 3 - кДНК hTERT, используемая в векторе INVAC-1;

SEQ ID NO: 4 - соответствующая аминокислотная последовательность;

SEQ ID NO: 5 - кДНК hTERT, используемая в векторе pUTD10Not;

SEQ ID NO: 6 - соответствующая аминокислотная последовательность;

SEQ ID NO: 7 - кДНК hTERT, используемая в векторе pUTD10Cog;

SEQ ID NO: 8 - соответствующая аминокислотная последовательность;
 SEQ ID NO: 9 - κДНК hTERT, используемая в векторе pUTD23Tyn;
 SEQ ID NO: 10 - соответствующая аминокислотная последовательность.

В предпочтительном воплощении изобретения используется нуклеиновая кислота, кодирующая белок по SEQ ID NO: 4.

Такая нуклеиновая кислота может включать последовательность SEQ ID NO: 3.

В другом воплощении нуклеиново-кислотная конструкция кодирует аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, 8 или 10 и предпочтительно включает SEQ ID NO: 5, 7 или 9.

В предпочтительном воплощении нуклеиновая кислота также может кодировать белок, который усиливает адресацию белка hTERT на протеасомы (повышая презентацию производных пептидов классом I). В частности, белок hTERT может быть слит по N-концу с таким белком, повышающим адресацию белка hTERT на протеасомы. Таким белком предпочтительно может быть убиквитин или же любой белок-шаперон, например, кальретикулин.

В перечне последовательностей:

SEQ ID NO: 11 - полноразмерная последовательность плазмиды INVAC-1, включающая κДНК Ubi-hTERT, кодируемого INVAC-1;

SEQ ID NO: 12 - соответствующая аминокислотная последовательность Ubi-hTERT, кодируемого INVAC-1;

SEQ ID NO: 13 - κДНК вставки pUTD10Not;

SEQ ID NO: 14 - соответствующая аминокислотная последовательность;

SEQ ID NO: 15 - κДНК вставки pUTD10Cog;

SEQ ID NO: 16 - соответствующая аминокислотная последовательность;

SEQ ID NO: 17 - κДНК вставки pUTD23Tyn;

SEQ ID NO: 18 - соответствующая аминокислотная последовательность.

В предпочтительном воплощении нуклеиново-кислотная конструкция кодирует аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12.

Более предпочтительно нуклеиново-кислотная конструкция может включать в себя SEQ ID NO: 11 или нуклеотиды 3488-6961 из SEQ ID NO: 11.

В другом воплощении нуклеиново-кислотная конструкция кодирует аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14, 16 или 18 и предпочтительно включает в себя последовательность SEQ ID NO: 13, 15 или 17.

В другом воплощении предусмотрены нуклеиново-кислотные конструкции, включающие последовательности, происходящие из обратной транскриптазы теломеразы человека (hTERT), причем данные последовательности, происходящие из hTERT:

- i) кодируют все или практически все эпитопы hTERT, в любом порядке, и
- ii) кодируют белок, лишенный каталитической активности теломеразы и сигнала ядрышковой локализации.

Нуклеиново-кислотные конструкции по изобретению находятся в выделенном виде.

Нуклеиновая кислота может представлять собой ДНК или РНК, но предпочтительно это ДНК, еще более предпочтительно двухцепочечная ДНК. Нуклеиново-кислотные конструкции не являются встречающимися в природе геномными нуклеиновыми кислотами, в частности, они не содержат интронов.

Эти конструкции в настоящем описании обозначаются как "перетасованные конструкции" или "полиэпитопные конструкции".

Термин "эпитоп hTERT" относится к таким аминокислотным фрагментам hTERT, которые являются антигенными детерминантами, т.е. они распознаются клетками иммунной системы и являются иммуногенными, т.е. могут вызывать иммунные ответы. Предпочтительно они специфически распознаются Т-клетками против hTERT. Описано несколько последовательностей иммуногенных эпитопов hTERT. Например, см. международную патентную заявку WO 07014740 насчет приуроченных к МНС класса I эпитопов hTERT. Некоторые другие описаны здесь (см. фиг. 27 и приведенную ниже таблицу).

Эти "перетасованные конструкции" способны вызывать специфические иммунные ответы против hTERT, т.е. цитотоксические Т-лимфоциты (CTLs) распознают их как эпитопы дикого типа.

Ни одна из этих "перетасованных конструкций" не совпадает с кодирующей последовательностью полноразмерного hTERT.

Термин "практически все эпитопы" означает, что нуклеиново-кислотная конструкция кодирует белок, который содержит по меньшей мере 80%, более предпочтительно по меньшей мере 85%, еще более предпочтительно по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% всех эпитопов hTERT дикого типа,

Полинуклеотидные звенья, кодирующие множественные эпитопы, могут располагаться в любом порядке: последовательно, т.е. 3'-конец первого полинуклеотидного звена непосредственно связан с 5'-концом второго полинуклеотидного звена (и так далее), в результате чего образуется полинуклеотид, кодирующий пептидные последовательности, состоящие исключительно из следующих друг за другом эпитопов. С другой стороны, множественные эпитопы могут разделяться спейсерами из одной аминокислоты или пептидными спейсерами, т.е. это значит, что различные полинуклеотидные звенья отделя-

ются друг от друга одним или несколькими кодонами, кодирующими соответственно одну или несколько аминокислот. Как правило, иммуногенные фрагменты hTERT могут отделяться друг друга посредством от 4 до 6 аминокислот Gly.

Порядок, в котором располагаются эпитопы, может быть определен специалистом в данной области по следующим критериям: некоторые порядки могут способствовать транскрипции и/или трансляции полинуклеотида, могут способствовать переносу полученного экспрессируемого полиэпитопа в эндоплазматический ретикулум (ER), особенно если трехмерная конформация воздействует на свойства, и могут способствовать процессингу полиэпитопа на несколько эпитопов или аналогов, чтобы избежать обработки перекрывающихся эпитопов.

В предпочтительном воплощении конструкцией из нуклеиновой кислоты кодируются все или практически все иммуногенные эпитопы hTERT от аминокислоты 24 до аминокислоты 1132, хотя бы и в любом порядке.

В приведенной ниже таблице представлены иммуногенные последовательности, которые могут располагаться в "перетасованной" конструкции.

Иммуногенная последовательность	SEQ ID NO:
R R L G P Q G W R L V Q R G D P A A F R A L V A Q C L V C V P W D A R	61
V S C L K E L V A R V L Q R L	62
V L A F G F A L L	63
R S Y L P N T V T D A L R G S G A W G L L L R R V G D D V L V H L L A R C A L F V L V A P S C A Y Q V C G P P L Y	64
R E A G V P L G L	65
R R R G G S A S R S L P L P K R	66
G R T R G P S D R G F C V V S P A R P A E E A T S L E G A	67
Y A E T K H F L Y S S G D K E Q L R P S F L L S S L R P S L	68
A R R L V E T I F L G S R P	69
R R L P R L P Q R Y W Q M R P L F L E L L G N H A Q C P	70
V L L K T H C P L	71
R E K P Q G S V A	72
E E D T D P R R L V Q L L R	73
V Y G F V R A C L R R L V P P G L W G S	74
R R F L R N T K K	75
H A K L S L Q E L	76
S V R G C A W L R	77
E H R L R E E I L A K F L H W L M S V Y V V E L L R S F	78
E T T F Q K N R L	79
K S V W S K L Q S I G I R Q H	80
A E V R Q H R E A R P A L L T S R L R F I P K	81
D Y V V G A R T F R R E K R A E R L T S R V K A L	82
Y E R A R R P G L L G A S V L G L	83
H R A W R T F V L R V R A Q D P P P E L Y F V K V D V T G A Y D T I P Q D R L T E V I A S I I K P Q	84
T Y C V R R Y A V V Q K A A H	85
T L T D L Q P Y M R Q F V A H L	86
S P L R D A V V I E Q S S S L N E A S S G L F D V F L R	87
A V R I R G K S Y	88
I L S T L L C S L C Y G D M E N K L	89
I R R D G L L L R L F L L V T P H L T H A K T F L R T L V R G V P E Y G C V V N L R K T V V N F	90
D E A L G G T A F V Q M P A H G L F P W C G L L L D T R T L E V Q S D Y S S Y	91
A G R N M R R K L F G V L R L K C H S L F L D L Q V N S L Q T	92
I Y K I L L L Q A Y R F H A C V L Q L P F H Q Q V	93
N P T F F L R V I S D T A S L C Y S I L K A K N A G M S	94
G A K G A A G P L	95
W L C H Q A F L L K L T R H R V T Y V P L L G S L R T A Q T Q L S R K L P G T T L	96
L E A A A N P A L P S D F K T I L	97

Соответственно, изобретением предусмотрены полиэпитопные нуклеиново-кислотные конструкции, включающие все или практически все иммуногенные последовательности, приведенные в виде SEQ ID NO: 61-97, в любом порядке.

Последовательность лишена каталитической активности теломеразы. В предпочтительном воплощении фрагмент, несущий каталитическую активность hTERT, содержит мутации, обеспечивающие инактивацию каталитической активности. Термин "мутация" включает замены одной или нескольких аминокислот, делеции одной или нескольких аминокислот и/или вставки одной или нескольких аминокислот. В предпочтительном воплощении белок лишен каталитической активности теломеразы посредством делеции по крайней мере одной аминокислоты.

Предпочтительно последовательность содержит делецию, предпочтительно делецию аминокислот VDD, как показано на фиг. 22. Предпочтительно белок hTERT лишен каталитической активности теломеразы посредством единственной делеции аминокислот 867-869 (VDD). В другом предпочтительном воплощении белок лишен каталитической активности теломеразы посредством дальнейшего удаления от 1 до 10, 11 или 12 аминокислот перед и/или после аминокислот 867-869 (VDD) hTERT.

Последовательность также лишена сигнала ядрышковой локализации. Этот сигнал ядрышковой локализации коррелирует с субклеточной локализацией hTERT и тем самым с её ферментативной активностью. Предпочтительно белок hTERT лишен сигнала ядрышковой локализации посредством делеции, по меньшей мере, аминокислот 1-23, еще более предпочтительно посредством делеции аминокислот 1-47 hTERT.

В предпочтительном воплощении нуклеиновая кислота также может кодировать белок, который усиливает адресацию белка hTERT на протеасомы (повышая презентацию производных пептидов классом I). В частности, белок hTERT может быть слит по N-концу с таким белком, повышающим адресацию белка hTERT на протеасомы. Таким белком предпочтительно может быть убиквитин или же любой белок-шаперон, например, кальретикулин.

AhTERT означает hTERT с делецией аминокислот 867-869 VDD.

Предпочтительная нуклеиново-кислотная конструкция включает, в любом порядке:

фрагмент 1, кодирующий от Leu24 до Gly109 у ΔhTERT (SEQ ID NO: 51),
фрагмент 2, кодирующий от Phe115 до Ala181 у ΔhTERT (SEQ ID NO: 52),
фрагмент 3, кодирующий от Trp203 до Ala242 у ΔhTERT (SEQ ID NO: 53),
фрагмент 4, кодирующий от Ser255 до Arg293 у ΔhTERT (SEQ ID NO: 54),
фрагмент 5, кодирующий от Pro320 до Thr420 у AhTERT (SEQ ID NO: 55),
фрагмент 6, кодирующий от Ala423 до Val526 у ΔhTERT (SEQ ID NO: 56),
фрагмент 7, кодирующий от Cys528 до Gln597 у ΔhTERT (SEQ ID NO: 57),
фрагмент 8, кодирующий от Arg599 до Lys757 у ΔhTERT (SEQ ID NO: 58),
фрагмент 9, кодирующий от Lys760 до Ile951 у ΔhTERT (SEQ ID NO: 59),
фрагмент 10, кодирующий от Asn958 до Asp1129 у ΔhTERT (SEQ ID NO: 60).

Предпочтительная конструкция кодирует SEQ ID NO: 48 (которая также именуется здесь "перетасованной"), как показано на фиг. 28.

Другая предпочтительная конструкция кодирует SEQ ID NO: 50 (которая также именуется здесь "инвертированной"), как показано на фиг. 29.

Генетические конструкции, иммуногенные композиции и их введение.

Предпочтительно нуклеиновая кислота представляет собой генетическую конструкцию, содержащую полинуклеотидную последовательность, как определено здесь, и регуляторные последовательности (как-то подходящие промоторы, энхансеры, терминаторы и т.п.), способствующие экспрессии (например, транскрипции и трансляции) белкового продукта в клетках хозяина или организме хозяина.

Генетические конструкции по изобретению могут представлять собой ДНК или РНК, а предпочтительно это двухцепочечная ДНК. Генетические конструкции по изобретению также могут находиться в виде, подходящем для трансформации заданных клеток хозяина или организма хозяина, в виде, подходящем для встраивания в геномную ДНК заданных клеток хозяина, или же в виде, подходящем для независимой репликации, поддержания и/или наследования в заданном организме хозяина. Например, генетические конструкции по изобретению могут находиться в виде вектора, такого, к примеру, как плазмида, космида, YAC, вирусный вектор или транспозон. В частности, вектор может представлять собой экспрессирующий вектор, т.е. вектор, который может обеспечивать экспрессию *in vitro* и/или *in vivo* (например, в подходящих клетках хозяина, организме хозяина и/или в экспрессирующей системе).

В предпочтительном аспекте, без ограничения, генетическая конструкция по изобретению включает в себя i) по меньшей мере одну нуклеиновую кислоту по изобретению; функционально связанную с ii) одним или несколькими регуляторными элементами, такими как промотор и необязательно подходящий терминатор; а также, необязательно, и iii) одним или несколькими другими элементами генетической конструкции типа последовательностей 3'- или 5'-UTR, лидерных последовательностей, селективных маркеров, маркеров экспрессии/генов-репортеров и/или таких элементов, которые могут способствовать, усиливать или повышать эффективность трансформации или встраивания.

В предпочтительном воплощении генетические конструкции могут быть получены путем расщепления полимера нуклеиновой кислоты рестрикционной эндонуклеазой и клонирования в плазмиду, содержащую промотор типа промотора SV40, промотора цитомегаловируса (CMV) или промотора вируса саркомы Рауса (RSV). В предпочтительном воплощении последовательности нуклеиновой кислоты TERT вставляются в экспрессирующую плазмиду NTC8685-eRNA41H (см. фиг 1A).

Другие векторы включают ретровирусные векторы, лентивирусные векторы, аденовирусные векторы, векторы из вируса осповакцины, поксвирусные векторы, векторы из вируса кори и векторы из аденоассоциированных вирусов.

Можно приготовить композиции, содержащие такие нуклеиновые кислоты или векторы. Композиции являются иммуногенными. Они могут содержать носители или наполнители, которые подходят для введения людям или млекопитающим (т.е. нетоксичные, а при необходимости и стерильные). Такие наполнители включают жидкие, полужидкие или твердые разбавители, служащие в качестве фармацевтических носителей, изотонические средства, стабилизаторы или какие-либо адъюванты. Разбавители могут включать воду, физраствор, декстрозу, этанол, глицерин и др. Изотонические средства могут включать хлорид натрия, декстрозу, маннит, сорбит и лактозу, среди прочего. Стабилизаторы включают альбумин, среди прочего. В вакцинных композициях можно использовать любые адъюванты, известные в данной области, в том числе масляные адъюванты, такие как полный адъювант Фрейнда и неполный адъювант Фрейнда, адъюванты на основе миколатов, бактериального липополисахарида (LPS), пептидогликанов, протеогликанов, гидроксида алюминия, сапонина, DEAE-декстрана, нейтральных масел (типа миглиола), растительных масел (типа арахисового масла), полиолой Pluronic®.

Нуклеиновые кислоты или композиции можно вводить непосредственно или же можно упаковывать в липосомы или наносить на коллоидные частицы золота перед введением. Методы упаковки ДНК вакцин в липосомы известны в данной области, к примеру, см. Murgay, 1991. Точно так же методы нанесения голый ДНК на золотые частицы изложены в Yang, 1992, а методы экспрессирования белков с помощью вирусных векторов приведены в Adolph, 1996.

Для генетической иммунизации вакцинные композиции предпочтительно вводятся внутривенно, подкожно, внутримышечно, в опухоли или в лимфоидные органы любого типа путем инъекции или газовой бомбардировки частицами, причем они вводятся в количестве, эффективном для стимуляции иммунного ответа в организме хозяина. В предпочтительном воплощении настоящего изобретения введение включает стадию электропорации, которая также обозначается здесь термином "электроперенос", в дополнение к операции инъекции (как описано в Mir, 2008, и Sardesai and Weiner, 2011).

Композиции также можно вводить *ex vivo* в лимфоидные или миелоидные клетки с помощью липосомной трансфекции, бомбардировки частицами или вирусной трансдукции (включая методы совместного культивирования). Затем обработанные клетки вводятся обратно подлежащему иммунизации субъекту.

Хотя и следует иметь в виду, что количество необходимого материала будет зависеть от иммуногенности каждой отдельной конструкции и не может быть предсказано *a priori*, однако процесс определения подходящей дозы для любой данной конструкции является несложным. В частности, соответствующим видам вводится ряд возрастающих доз, к примеру, начиная с 5 до 30 мкг или предпочтительно 20-25 мкг, от 500 мкг до 5 мг, предпочтительно 500-1500 мкг, 500-1200 мкг или 500-1000 мкг, и наблюдается возникающий иммунный ответ, к примеру, путем определения клеточного иммунного ответа методом ELISpot на IFN γ (как описано в экспериментальном разделе), путем определения реакций CTL методом лизиса *in vivo* или методом высвобождения хрома либо путем определения Th (хелперных Т-клеток) методом высвобождения цитокинов.

В предпочтительном воплощении схема вакцинации включает в себя от одной до трех инъекций, которые предпочтительно повторяются через 3 или 4 недели.

В предпочтительном воплощении график вакцинации может состоять из одной или двух инъекций с последующим через 3 или 4 недели по меньшей мере одним циклом от трех до пяти инъекций.

В другом воплощении первичная доза (прайм) состоит из 1-3 инъекций, а впоследствии по меньшей мере одна повторная доза (буст) каждый год или через каждые два года, к примеру.

Все это лишь примеры, предусматриваются и любые другие схемы вакцинации.

Профилактика или лечение опухолей.

Нуклеиновые кислоты или иммуногенные композиции, которые описаны выше, применимы в способе профилактики или лечения опухолей у пациентов.

Описан способ профилактики или лечения опухолей у пациентов, который включает введение эффективного количества указанной нуклеиновой кислоты или иммуногенной композиции нуждающемуся в этом пациенту. Данная нуклеиновая кислота или иммуногенная композиция вводится в количестве, достаточном для того, чтобы вызвать иммунный ответ у пациента.

Опухоль может представлять собой любую нежелательную пролиферацию клеток, в частности, доброкачественную опухоль или злокачественную опухоль, особенно рак.

Рак может быть на любой стадии развития, в том числе метастатической стадии. Рак может быть хроническим или не хроническим (острым).

В предпочтительном воплощении опухоль представляет собой солидный рак или карциному. Примеры включают меланомы, опухоли головного мозга типа глиобластомы, нейробластомы и астроцитомы, карциномы мочевого пузыря, молочной железы, шейки матки, толстой кишки, легких, в особенности немелкоклеточный рак легких (NSCLC), рак поджелудочной железы, простаты, головы и шеи или рак желудка.

В другом воплощении опухоль может представлять собой жидкую опухоль, например, гемопоэтическую опухоль или лейкемию типа хронической или острой лимфоцитарной лейкемии, хронической

или острой миелоидной лейкемии, лимфомы, включая болезнь Ходжкина, множественной миеломы, злокачественной миеломы.

В предпочтительном воплощении лечение по изобретению может комбинироваться с традиционной терапией, включая химиотерапию, лучевую терапию или хирургию. Также может применяться комбинирование с молекулами иммуномодулирующих адъювантов типа GM-CSF или цитокинами типа IL-2 или IL-12.

Фигуры и примеры иллюстрируют изобретение, не ограничивая его объем.

Пример I.

Сокращения:

AA: аминокислота;

APC: антигенпрезентирующая клетка;

п.н.: пара нуклеотидов (оснований);

CTL: цитотоксический Т-лимфоцит;

CMV: цитомегаловирус;

ДНК: дезоксирибонуклеиновая кислота;

EP: электропорация;

HTLV-1: Т-лимфотропный вирус I типа человека;

hTERT: обратная транскриптаза теломеразы человека;

ID: внутрикожно;

IM: внутримышечно;

IV: внутривенно;

LTRs: длинные концевые повторы;

NoLS: последовательность ядрышковой локализации;

PBMC: мононуклеары периферической крови;

RIG-I: индуцируемый ретиноевой кислотой ген 1;

РНК: рибонуклеиновая кислота;

RT: комнатная температура;

RTA: относительная теломеразная активность;

SC: подкожно;

TRAP: протокол амплификации теломерных повторов;

TERT: обратная транскриптаза теломеразы;

Ubi: убиквитин;

VDD: валин-аспарагиновая кислота - аспарагиновая кислота.

Материалы и методы Плазмидные ДНК-векторы INVAC-1

INVAC-1 представляет собой экспрессирующий вектор типа плазмиды в 7120 п.н., кодирующий слитую конструкцию убиквитин человека-теломеразы из 1158 а.к. (Ubi-hTERT), что соответствует белку примерно в 127,4 кДа (фиг. 1A и 16). Поскольку INVAC-1 предназначена для применения на людях, то по соображениям безопасности у теломеразы была инактивирована энзиматическая активность обратной транскриптазы. Так, последовательность кодируемой INVAC-1 TERT человека в каталитическом сайте была модифицирована посредством делеции 9 п.н., кодирующих три аминокислоты: валин-аспарагиновая кислота-аспарагиновая кислота (а.к. 867-869), сокращенно VDD в однобуквенной кодировке (фиг. 2A). Кроме того, 47 а.к. в N-концевой части белка, которые включают последовательность ядрышковой локализации (NoLS), необходимую для субклеточной локализации теломеразы (Yang, 2002), были заменены на последовательность (а.к. 1-76), кодирующую убиквитин (Ubi).

Трансген Ubi-hTERT вставляли в каркас проверенного вектора NTC (Nature Technology Corporation, Lincoln, Nebraska), сочетающего тщательно разработанные синтетические гены для высокого выхода бактериальной продукции, и повышенной экспрессии в клетках млекопитающих и вследствие этого эффективные иммунные реакции.

Экспрессия целевого гена управляется из оптимизованного химерного промотора-интрона (синтетический интрон R SV40-CMV-HTLV-1), состоящего из промотора CMV и начала экзона 1, последовательности R HTLV-I, которая содержит 5'-акцепторный сайт сплайсинга, синтетический 3'-акцепторный сайт на основе интрона β-глобина кролика, усилитель сплайсинга экзона 2, содержащий сайт связывания богатого серином-аргинином (SR) белка для улучшения экспорта РНК (Lavigne et al., 1993), и последовательность Козака из экзона 2 перед старт-кодоном целевого гена. ДНК между стоп-кодоном и терминатором ограничили, чтобы уменьшить возможность скрытой экспрессии пептида или непреднамеренного изменения экспрессии посредством микроРНК.

Для улучшения клеточных иммунных реакций вектор кодирует транскрибируемую РНК-полимеразой III двухцепочечную РНК агониста индуцируемого ретиноевой кислотой гена-1 (RIG-I) активатора врожденного иммунитета.

У этого вектора нет известных признаков вирулентности. Плазмида не подвергается репликации в эукариотических клетках мишени. Сам каркас вектора не содержит последовательностей, кодирующих белки, и в каркасе вектора не было установлено альтернативных открытых рамок считывания, кодирую-

щих белки, следовательно, не имеется генов устойчивости к антибиотикам. Отбор плазмиды осуществляется при помощи селективного маркера для отбора на лишенной антибиотиков сахарозе (RNA-OUT).

Синтез и клонирование ген.а

Ген Ubi-hTERT синтезировали de novo методом сборки из перекрывающихся олигонуклеотидов - 40-меров (GeneCust, Люксембург). Делали несколько консервативных замен оснований, чтобы устранить рестрикционные сайты и истощить богатые GC последовательности. Вставку клонировали в экспрессирующий вектор pcDNA3.1(+)(Invitrogen, Carlsbad, США) по сайтам клонирования HindIII-XbaI и проверяли секвенированием.

Субклонирование вставки Ubi-hTERT в клонирующий вектор NTC8685-eRNA41H-HindIII-XbaI.

Вставку убиквитин-теломеразы клонировали в экспрессирующий вектор NTC8685-eRNA41H-HindIII-XbaI, разработанный на фирме NTC. Однако их наиболее подходящий вектор NTC8685-eRNA41H (№ NTC-DV8685-41HLV) не имеет рестрикционных сайтов, совместимых со вставкой Ubi-hTERT. Соответственно, этот вектор расщепляли с помощью SalI и BglII и лигировали с синтетическим двухцепочечным олигонуклеотидом, содержащим соответствующие рестрикционные сайты для субклонирования Ubi-hTERT, т.е. Hind III-XbaI:

SalI **HindIII** SmaI **XbaI** BglII

GTCGACAAGCTTCCCGGGTCTAGAAGATCT (SEQ ID NO: 23)

Этот новый вектор (NTC8685-eRNA41H-HindIII-XbaI), который теперь включает в себя вышеприведенный полилинкер, проверяли путем рестрикционного расщепления и секвенирования с помощью праймеров pVAC5' (GCTTTTCTGCCAGGTGCTGA, SEQ ID NO: 24) и pVAC3' (GCCA-GAAGTCAGATGCTCAA; SEQ ID NO: 25) для отжига с последовательностями перед и после сайта полилинкера соответственно.

Изготовленный по заказу вектор NTC8685-eRNA41H-HindIII-XbaI расщепляли с помощью HindIII и XbaI и вектор в 3631 п.н. очищали в геле от линкера в 12 п.н. Конструкцию pcDNA3.1-Ubi-hTERT расщепляли с помощью HindIII и XbaI и вставку Ubi-hTERT в 3489 п.н. переносили путем лигирования в акцептор NTC8685-eRNA41H-HindIII-XbaI, получая NTC8685-eRNA41H-HindIII-XbaI-Ubi-hTERT (INVAC-1) (фиг. 1A). Продукт лигирования путем трансформации вводили в клетки NTC4862 для свободного от антибиотиков отбора (DH5α attλ::P_{5/6} /6-RNA-IN-SacB, catR) (№ NTC-DVU-CC1).

Полученный вектор проверяли путем рестрикционного расщепления (фиг. 1B): BglII/NotI = полосы в 3496, 3262, 220, 142 п.н.; NcoI = полосы в 4084, 3036 п.н.; HindIII/XbaI = полосы в 3631, 3489 п.н., а концы вставки Ubi-hTERT проверяли путем секвенирования ДНК с помощью праймеров pVAC5' и pVAC3'. Не было выявлено никаких изменений нуклеотидов.

Продукция плазмиды.

INVAC-1 сначала производилась на фирме NTC в условиях уровня качества для исследования. ДНК плазмиды путем трансформации вводили в клетки E. coli NTC4862 с помощью электропорации. Клетки высевали и культивировали на средах с 6% сахарозы согласно рекомендациям производителя (NTC Instruction Manual, June 2011). После экстрагирования плазмидную ДНК ресуспендировали в лишенном эндотоксинов 1×PBS до конечной концентрации 2 мг/мл.

Впоследствии INVAC-1 производилась на фирме Eurogentec (Бельгия) в масштабе GLP и GMP и на производстве типа GMP. В это же время проводилось полноразмерное секвенирование плазмиды INVAC-1.

Производные INVAC-1.

Все конструкции производных INVAC-1 представляют собой плазмиды из двухцепочечной ДНК примерно в 8,9 т.п.о., кодирующие слитые белки убиквитин-теломеразы человека, которые энзиматически неактивны (фиг. 2A). Трансгены Ubi-hTERT вставляли в вектор pcDNA3.1(+)(Invitrogen (5,4 т.п.о.), происходящий из pcDNA3.0, который был разработан для стабильной или краткосрочной экспрессии на высоком уровне в клетках млекопитающих. Этот вектор содержит самый ранний промотор цитомегаловируса человека (CMV-IE) и сигнал полиаденилирования бычьего гормона роста (BHG-polyA) в качестве последовательности терминации.

pUTD10Not (сокращенно Δ10Not).

Кодирующая hTERT последовательность располагается между нуклеотидом 923 и 4492 п.н. каркаса плазмиды pcDNA3.1. pUTD10Not кодирует слитый белок убиквитин человека-теломеразы из 1189 а.к. (Δ10Not), что соответствует молекулярной массе примерно в 130,8 кДа (фиг. 2A). Из hTERT были удалены первые 23 аминокислоты (а. к. 1-23), которые заменены полипептидом убиквитина (76 а.к.). В области каталитического сайта введена дополнительная делеция между аминокислотами 912-913 (метка *, фиг. 17), что соответствует а.к. 860-869 ((DGLLLLRLVDD; SEQ ID NO: 21) у hTERT дикого типа (номер доступа NM_198253). Эта делеция 10 аминокислот включает делецию 3 а.к. (ΔVDD), приводящую к инактивации ферментативной активности hTERT, и делецию дополнительных 7 а.к. перед последовательностью VDD. Четырнадцать аминокислот на

C-концевой последовательности Ubi-hTERT кодируют эпитопный тег V5 (фиг. 2A).

pUTD10Cog (сокращенно Δ10Cog).

Кодирующая hTERT последовательность располагается между нуклеотидом 923 и 4492 п.н. каркаса плазмиды pсDNA3.1. pUTD10Cog кодирует слитый белок убиквитин человека-теломераза из 1189 а.к. (Δ10Cog), что соответствует молекулярной массе примерно в 130,8 кДа (фиг. 2А). Из hTERT были удалены первые 23 аминокислоты (а. к. 1-23), которые заменены полипептидом убиквитина (76 а.к.). В области каталитического сайта введена дополнительная делеция между аминокислотами 912-913 (метка *, фиг. 18), что соответствует а.к. 867-876 (VDDFLLVTPH; SEQ ID NO: 22) у hTERT дикого типа (номер доступа NM_198253). Эта делеция 10 аминокислот включает делецию 3 а.к. (ΔVDD), приводящую к инактивации ферментативной активности hTERT, и делецию дополнительных 7 а.к. после последовательности VDD. Четырнадцать аминокислот на С-концевой последовательности Ubi-hTERT кодируют эпитопный тег V5 (фиг. 2А).

pUTD23Tyn (сокращенно A23).

Кодирующая hTERT последовательность располагается между нуклеотидом 923 и 4453 п.н. каркаса плазмиды pсDNA3.1. pUTD23Tyn кодирует слитый белок убиквитин человека-теломераза из 1176 а.к. (A23), что соответствует молекулярной массе примерно в 129,4 кДа (фиг. 2А). Из hTERT были удалены первые 23 аминокислоты (а.к. 1-23), которые заменены полипептидом убиквитина (76 а.к.). В области каталитического сайта введена дополнительная делеция между аминокислотами 909-910 (метка *, фиг. 19), что соответствует а.к. 857-879 (IRRDGLLLRLVDDFLLVTPHLTH; SEQ ID NO: 26) у hTERT дикого типа (номер доступа NM_198253). Эта делеция 23 аминокислот включает делецию 3 а.к. (ΔVDD), приводящую к инактивации ферментативной активности hTERT, и делеции дополнительных 10 а.к. перед и 10 а.к. после последовательности VDD. Четырнадцать аминокислот на С-концевой последовательности Ubi-hTERT кодируют эпитопный тег V5 (фиг. 2А).

Синтез и клонирование генов.

Гены синтезировали de novo в виде слитых конструкций убиквитин-теломераза методом сборки из перекрывающихся олигонуклеотидов - 40-меров (GeneCust, Люксембург). Синтез генов включал уникальные фланговые рестрикционные сайты HindIII/XbaI для субклонирования гена в желательной системе экспрессии. Синтезированные гены клонировали между рестрикционными сайтами HindIII и XbaI экспрессирующего вектора pсDNA3.1(+)(Invitrogen, Carlsbad, США). Последовательности плазмид проверяли путем секвенирования с помощью праймеров PEGFP-N5' (CGGTGGGAGGTCTATATAAG; SEQ ID NO: 27) и BGH (CAGGGTCAAGGAAGGCAC; SEQ ID NO: 28).

Производство плазмид

Все производные INVAC-1 подвергали трансформации и производили в клетках E.coli 5-α (fhuA2Δ(argF-lacZ)U169 phoA glnV44 Ф80 Δ(lacZ)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17) (Lucigen Corporation, Middleton, США, № 60602-2) на фирме RD Biotech (Besançon, Франция). Готовили концентрированные препараты лишенных эндотоксинов плазмид типа гигапреп (2 мг/мл) и ресуспендировали их в стерильном 1×PBS. Векторы проверяли методом рестрикционного картирования (HindIII-XbaI; фиг. 2В).

pTRIP-CMV-hTERT.

pTRIP-CMV-hTERT кодирует белок TERT дикого типа человека (hTERT) из 1132 а.к. (что соответствует примерно 124,5 кДа) с каталитической активностью. Эта плазида использовалась в качестве положительного контроля для анализов in vitro. Конструкция была впервые описана в патентной заявке WO 2007/014740. pTRIP-CMV-hTERT конструировали, сначала субклонировав вставку EcoRI-SalI hTERT, полученную из плазмиды pBABE-hygro-hTERT (любезно предоставленной Dr. Robert Weinberg), в вектор pSP73 (Promega Life Science, Wisconsin, США), получая конструкцию pSPHhTERT. Затем фрагмент BglII-SalI вставляли в ретровирусный вектор pTRIP-CMV, расщепленный BamHI и XhoI, получая pTRIP-CMV-hTERT. Экспрессия hTERT управляется промотором цитомегаловируса человека (CMV).

Плазмиду pTRIP-CMV-hTERT подвергали трансформации и производили в клетках E.coli 5-α (fhuA2Δ(argF-lacZ)U169 phoA glnV44 Ф80 Δ(lacZ)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17) (Lucigen Corporation, Middleton, США, № 60602-2) на фирме RD Biotech (Besançon, Франция).

Готовили концентрированный препарат лишенной эндотоксинов плазмиды типа гигапреп (2 мг/мл) и ресуспендировали его в стерильном 1×PBS. Полученный вектор проверяли путем расщепления рестрикционными ферментами (EcoRI + BamHI = полосы в 10286+ 2720 +886 п.н.).

pNTC-hTERT.

pNTC-hTERT кодирует белок TERT дикого типа человека (hTERT) из 1132 а.к. с каталитической активностью (SEQ ID NO: 2). Эта плазида использовалась для исследования широты реакции hTERT-специфичных Т-клеток in vivo в сравнении с конструкцией INVAC-1.

Вставку hTERT дикого типа синтезировали de novo с сайтами клонирования HindIII-XbaI методом сборки из перекрывающихся олигонуклеотидов (GenScript, США) Синтетическую конструкцию (3417 п.н.) клонировали в pUC57 (2710 п.н.) по сайтам

HindIII и XbaI, а затем проверяли путем секвенирования с помощью праймеров M13/pUC (-20) и M13/pUC (-26) и рестрикционного картирования (HindIII/XbaI). После этого вставку hTERT субклониро-

вали на фирме NTC в клонирующий вектор NTC8685-eRNA41H-HindIII-XbaI, как описано выше (см. конструкцию INVAC-1). Полученный вектор pNTC-hTERT проверяли путем рестриционного расщепления (XmaI = полосы в 4375, 2041, 506, 120 п.н.; BamHI/XmnI = полосы в 6887, 155 п.н.; HindIII/XbaI = полосы в 3631, 3411 п.н.) и секвенирования ДНК с помощью праймеров pVAC5', pVAC3' и hTERTseq (5'-GGCAAGTCCTACGTCCAGTG-3'; SEQ ID NO: 44).

Плазмида pNTC-hTERT производилась на фирме NTC в условиях уровня качества для исследования, как описано выше для плазмиды INVAC-1.

pNTC-hTERT-ΔVDD.

pNTC-hTERT-ΔVDD кодирует последовательность TERT человека (hTERT) в 1129 а.к., модифицированную в каталитическом сайте делецией 9 п.н., кодирующих валин-аспарагиновая кислота-аспарагиновая кислота (ΔVDD; а.к. 867-869). Эта плазмида использовалась для исследования широты реакций hTERT-специфичных Т-клеток *in vivo* в сравнении с конструкцией INVAC-1.

Последовательность ДНК hTERT-ΔVDD идентична hTERT дикого типа, за исключением делеции 3 аминокислот (ΔVDD). Вставку ДНК hTERT в 167 п.н., включающую фрагмент BamHI/XmnI в 152 п.н., но с делецией ΔVDD и дополнительным рестриционным сайтом EcoRV, синтезировали *de novo* на фирме GenScript. Этот синтетический фрагмент клонировали в вектор pUC57 (2710 п.н.) по сайтам клонирования EcoRV. Синтезированный ген проверяли путем секвенирования с помощью праймеров M13/pUC (-20) и M13/pUC (-26) и рестриционного расщепления (BamHI/NdeI). Затем этот вектор расщепляли по сайтам BamHI/XmnI и фрагмент ΔVDD-BamHI/XmnI клонировали в предварительно расщепленный BamHI/XmnI участок hTERT вектора pNTC-hTERT (полосы в 6887, 155 п.н.). Полученный при этом вектор pNTC-hTERT-ΔVDD проверяли путем рестриционного расщепления (XmaI = полосы в 4375, 2032, 506, 120 п.н.; BamHI/XmnI = полосы в 6887, 146 п.н.; HindIII/XbaI = полосы в 3631, 3402 п.н.) и секвенирования ДНК с помощью праймеров pVAC5', pVAC3' и hTERTseq (5'-GGCAAGTCCTACGTCCAGTG-3'; SEQ ID NO: 44).

Культивирование клеток и краткосрочная трансфекция для анализа методами вестерн-блот и TRAP.

Клетки линии CrFK (из почек кошки CraNdell Rees), HEK293T (эмбриональных почек человека) и HeLa (Henrietta Lacks' - аденокарцинома шейки матки человека) культивировали в модифицированной Дюльбекко среде Игла (DMEM) с добавлением 10% инактивированной нагреванием фетальной телячьей сыворотки (PAA, Velizy-Villacoublay, Франция) и 1% пенициллина/стрептомицина (Life Technologies, Saint-Aubin, Франция).

Клетки линии QT6 (фибросаркома японского перепела) культивировали в среде Ham's F10 (Eurobio, Courtaboeuf, Франция) с добавлением 10% инактивированной нагреванием фетальной телячьей сыворотки (PAA), 1% пенициллина/стрептомицина (Life Technologies), 1% куриной сыворотки (PAA), 10 мМ L-глутамин (Sigma-Aldrich, St. Louis, США), 0,5% триптозного бульона (Sigma-Aldrich, St. Louis, США).

Клетки культивировали в виде монослоя в чашках на 75 см² при 37°C в увлажненной атмосфере, содержащей 5% CO₂. Клетки культивировали до конfluence 70-80% в день трансфекции. Для метода вестерн-блот высевали 5×10⁵ клеток в 6-луночные планшеты для тканевой культуры и инкубировали в течение 24 ч. Для метода TRAP высевали 7×10⁵ клеток в 6-луночные планшеты для тканевой культуры и инкубировали в течение 24 ч.

Конструкции INVAC-1 и производных INVAC-1 вводили путем трансфекции в клетки мишени с помощью реагента для трансфекции - катионного полимера jetPrime согласно инструкциям изготовителя (Polyplus-transfection Inc., Франция). В качестве положительного контроля использовали клетки, трансфицированные плазмидой pTRIP-CMV-hTERT, а в качестве отрицательного контроля - нетрансфицированные клетки или клетки, трансфицированные пустой плазмидой pNTC8685-eRNA41H. Через 4 ч трансфекционные среды удаляли и заменяли на 2 мл культуральной среды DMEM. После соответствующего времени для трансфекции - 18-96 ч для метода вестерн-блот и 24 ч для метода TRAP, клетки собирали и подвергали анализу на экспрессию и активность теломеразы.

Вестерн-блот.

Для метода вестерн-блот трансфицированные клетки CrFK и HEK293T лизировали на льду в течение 10-20 мин в буфере RIPA (Sigma-Aldrich, St. Louis, США) с добавлением коктейля ингибиторов протеаз (Roche Diagnostic, Indianapolis, США). Лизаты осветляли центрифугированием при 14000 об/мин в течение 15 мин при 4°C. Собирали супернатанты и измеряли концентрацию белка колориметрическим методом Брэдфорда. Образцы белка денатурировали 5 мин при 95°C, разделяли на 4-12% гелях Nu-PAGE® Novex Bis-Tris (Invitrogen, Carlsbad, США) и подвергали электроблоттингу на мембраны PVDF (пакет для переноса iBlot®, Invitrogen, Carlsbad, США) с помощью устройства iBlot® (Invitrogen, Carlsbad, США). Для определения молекулярной массы использовали маркер молекулярной массы белка Sharp Prestained Protein Ladder Novex® (Invitrogen, Carlsbad, США). Мембраны нарезали примерно по 60 кДа и блокировали с помощью 1×PBS, 0,05% Tween® 20, 3% молока. Верхнюю часть мембраны анализировали с помощью моноклонального антитела кролика против hTERT (Abeam, Cambridge, UK), разведенного 1/2000 в блокирующем буфере, или моноклонального антитела мыши против V5 (Invitrogen, Carlsbad, США), разведенного 1/5000. Нижнюю часть мембраны анализировали с помощью монокло-

нального антитела мыши против β -актина (Sigma-Aldrich SARL, Saint-Quentin Fallavier, Франция), разведенного 1/5000. Наконец, соответствующие белки визуализировали путем окрашивания с помощью соответствующего вторичного антитела, конъюгированного с пероксидазой хрена (HRP), в течение 1 ч при комнатной температуре - соединенного с HRP антитела против мыши (GE Healthcare, Velizy, Франция), разведенного 1/5000 или соединенного с HRP антитела против кролика (Cell Signaling, Danvers, США), разведенного 1/1000 в блокирующем буфере. Сигналы на иммуноблоте проявляли методом усиленной хемиллюминесценции с помощью набора реагентов с хемиллюминесцентным субстратом ECL для HRP. Пленки и соответствующие кассеты приобретали у фирмы GE Healthcare (Buckinghamshire, UK).

Метод TRAP.

Активность теломеразы определяли по протоколу амплификации теломерных повторов (TRAP) (Kim et al., 1994) с помощью набора TeloTAGGG Telomerase PCR ELISAPlus kit (Roche Diagnostic GmbH, Mannheim, Германия) согласно инструкциям изготовителя. Через 24 ч после трансфекции, как описано выше, собирали клетки CrFK. Клетки промывали 1×PBS с последующим центрифугированием при 1600 об/мин в течение 5 мин при 4°C. Клетки ресуспендировали в 0,2 мл буфера для лизиса и инкубировали на льду в течение 30 мин. Лизаты осветляли центрифугированием при 14000 об/мин, 20 мин при 4-8°C. Собирали супернатанты и измеряли концентрацию белка колориметрическим методом Брэдфорда. Супернатанты использовали для опосредованного теломеразой удлинения теломерных последовательностей, а продукты амплифицировали методом ПНР с использованием биотинилированных праймеров. Каждый клеточный супернатант предварительно разделяли на две порции перед выполнением анализа: одну использовали для получения отрицательного контроля путем тепловой инактивации теломеразы в течение 10 мин при 85°C, а другую использовали для оценки опосредованного теломеразой удлинения теломерных последовательностей. Кроме того, одновременно амплифицировали внутренний стандарт длиной 216 п.н., присутствующий в реакционной смеси, чтобы исключить ложноотрицательные результаты из-за ингибиторов ДНК-полимеразы Taq, которые могут присутствовать в лизатах. В качестве отрицательного контроля использовали буфер для лизиса. Все реакционные смеси инкубировали 20 мин при 25°C, а затем 5 мин при 94°C.

Теломеразные продукты амплифицировали за 30 циклов ПЦР: 30 с при 94°C, 30 с при 50°C, 90 с при 72°C, а в завершение 1 цикл в течение 10 мин при 72°C и оставляли при 4°C.

По 2,5 мкл продуктов ПЦР-амплификации инкубировали 10 мин при комнатной температуре с денатурирующим реагентом, представленным в наборе. После инкубации в каждую лунку добавляли 100 мкл буфера для гибридизации. Каждый раствор перемешивали, по 100 мкл переносили в покрытый стрептавидином микропланшет и инкубировали 2 ч при 37°C с осторожным перемешиванием (300 об/мин). Затем лунки отмывали промывочным буфером и инкубировали со связанным с пероксидазой хрена (HRP) антителом против дигоксигенина (1/50) в течение 30 мин при комнатной температуре. Затем добавляли субстрат HRP (TMB) на 15 мин при комнатной температуре для колориметрического измерения. Реакцию останавливали с помощью стоп-реагента для ELISA.

Уровень теломеразной активности в каждом образце определяли путем сравнения сигнала от образца с сигналом, полученным с использованием известного количества матрицы положительного контроля (ДНК-матрица с такой же последовательностью, как у продукта теломеразы с 8 теломерными повторами). Значения поглощения приводятся в виде A_{450} против холостой пробы (длина волны сравнения: A_{690} нм). Относительную теломеразную активность (RTA) получали по следующей формуле:

$$RTA = [(A_S - A_{S0})/A_{S,IS}]/[(A_{TS8} - A_{TS8,0})/A_{TS8,IS}] \times 100,$$

где A_S - поглощение образца,

A_{S0} - поглощение обработанного нагреванием образца,

$A_{S,IS}$ - поглощение внутреннего контроля (IS) в образце,

A_{TS8} - поглощение контрольной матрицы (TS8),

$A_{TS8,0}$ - поглощение буфера для лизиса,

$A_{TS8,IS}$ - поглощение внутреннего контроля (IS) в контрольной матрице (TS8).

Иммунофлуоресценция.

Клетки CrFK, HEK293T, Hela и QT6 высевали на 8-луночные предметные стекла Lab-Tek® (Sigma-Aldrich, St. Louis, США) по 2×10^4 клеток на лунку в 200 мкл культуральной среды и инкубировали в течение ночи при 37°C, 5% CO₂. На следующий день культуральную среду отбрасывали и добавляли 200 мкл свежей среды. В соответствующие лунки добавляли 10 мкл раствора смеси, содержащей 0,2 мкг INVAC-1, pTRIP-CMV-hTERT или контрольной пустой плазмиды pNTC8685-eRNA41H и 0,5 мкл Fugene HD (Promega France, Charbonnières-les-Bains, Франция) в OptiMEM (Life Technologies, Saint-Aubin, Франция). В качестве отрицательного контроля использовали по 2×10^4 необработанных клеток на лунку. Предметные стекла инкубировали в течение 24 и 48 ч при 37°C, 5% CO₂. Трансфицированные клетки тщательно промывали 1×PBS и в каждую лунку добавляли 200 мкл 2% PFA на 10 мин при 4°C для того, чтобы фиксировать и сделать клетки проницаемыми. Затем лунки дважды промывали 1×PBS с 0,05% Tween®20 и инкубировали 30 мин при комнатной температуре с 200 мкл блокирующего раствора (0,5% Triton X100, Sigma-Aldrich; 3% BSA, Sigma-Aldrich; 10% козьей сыворотки, Invitrogen; в 1×PBS с 0,05%

Tween®20). На клетки наносили первичное моноклональное антитело кролика против hTERT (Abcam, Cambridge, UK), разведенное 1/100 в блокирующем буфере, на 1,5 ч при комнатной температуре с перемешиванием. После трех промывок в 1×PBS с 0,05% Tween®20 наносили вторичное козье антитело против кролика с Alexa Fluor 488® (Life Technologies, Saint-Aubin, Франция), разведенное в блокирующем растворе (1/500), на 45 мин при комнатной температуре с перемешиванием. Лунки три раза отмывали 1×PBS с 0,05% Tween®20 и заключали в заливочную среду VectaShield®, содержащую DAPI (Vector Laboratories, Cambridgeshire, UK). Предметные стекла анализировали под флуоресцентным микроскопом (Axio Observer ZI, Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena, Германия), оснащенным системой обработки и анализа изображений (AxioVision, Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena, Германия).

Мыши.

Самок мышей C57BL/6 (6-8-недельных) приобретали у Janvier Laboratories (Saint-Berthevin, France).

Использовали две трансгенные линии мышей: HLA-B*0702 и HLA-A2/DR1.

Трансгенные мыши HLA-B*0702 экспрессируют домены $\alpha 1$ - $\alpha 2$ молекулы HLA-B*0702 человека и домен $\alpha 3$ молекулы H2D мыши. Эти мыши не экспрессируют молекулы H2-D^b и H2-K^b (Rohrlich et. al., 2003).

Трансгенные мыши HLA-A2/DR1 экспрессируют домены $\alpha 1$ - $\alpha 2$ HLA-A*0201 человека, домен $\alpha 3$ молекулы H2D мыши и $\beta 2$ -микроглобулин человека. Кроме того, эти трансгенные мыши экспрессируют молекулы HLA-DRB1*0101 и HLA-DRA*0101 человека. Они нокауты по генам H2-D^b, H2-K^b и IA^b мыши (Pajot et. al., 2004).

Обе трансгенные линии мышей использовались в возрасте от 6 до 10 недель и их получали из Pasteur Institute of Paris. Животных содержали в свободном от патогенов виварии Института Пастера (виварий Lwoff n°22, соглашение № В 7515-07). Перед внутрикожной (ID), внутримышечной (IM) или подкожной (SC) иммунизацией или внутривенным (IV) введением мышьяк анестезировали раствором смеси 2% ксилазина (Rompun, Bayer Santé, Loos, Франция) и 8% кетамина (Imalgen 1000, Merial, Lyon, Франция) в 1× фосфатно-солевом буфере (1×PBS, Life Technologies, Saint-Aubin, Франция) внутривенно (IP) в соответствии с весом индивидуального животного и продолжительностью анестезии. Все работы с животными велись в строгом соответствии с принципами надлежащего обращения с животными и соответствовали местным нормам по экспериментам на животных (Директива 2010/63/UE).

Пептиды hTERT.

Пептиды hTERT, рестрицированные (ограниченные по) HLA-B*0702, HLA-A*0201 или HLA-DR, были описаны ранее (см. ссылки в табл. 1). Пептиды hTERT, рестрицированные (ограниченные по) H2-D^b и H2-K^b, определяли путем прогнозирования эпитопов *in silico* для связывания с молекулами МНС мыши класса I с помощью четырех алгоритмов, доступных в сети: Syfpeithi (<http://www.syfpeithi.de/>), Vimas (<http://www-bimas.cit.nih.gov/>), NetMHCpan и SMM (<http://tools.immuneepitope.org/main/>). Все синтетические пептиды приобретали в лиофилизованном виде (чистота >90%) у фирмы Proimmune (Оксфорд, Великобритания). Лиофилизованные пептиды растворяли в стерильной воде при 2 мг/мл и хранили при -20°C до использования. Сведения о последовательностях пептидов и МНС-рестрикции представлены в табл. 1.

Таблица 1

Пептиды hTERT и MHC-рестрикция

Код пептида (ссылка)	Последовательность	MHC-рестрикция	Линия мышей
277 (Adotevi et al., 2006)	RPAEEATSL (SEQ ID NO: 30)	HLA-B*0702	трансгенные HLA-B7
351 (Adotevi et al., 2006)	RPSLTGARRL (SEQ ID NO: 29)		
1123 (Cortez-Gonzalez et al., 2006)	LPSDFKIL (SEQ ID NO: 31)		
540 (Firat et al., 2002)	ILAKFLHWL (SEQ ID NO: 32)	HLA-A*0201	трансгенные HLA-A2/DR1
Y572 (Firat et al., 2002)	YLFFYRKS (SEQ ID NO: 33)		
Y988 (Firat et al., 2002)	YLQVNSLQTV (SEQ ID NO: 34)		
UCP2.1 (Dossset et al., 2012)	SVWSKLQSI (SEQ ID NO: 35)	HLA-A*0201	
UCP4.1 (Dossset et al., 2012)	SLCYSILKA (SEQ ID NO: 36)	HLA-A*0201	
UCP2 (Godet et al., 2012)	KSVWSKLQSIGIRQH (SEQ ID NO: 37)	HLA-DR	трансгенные HLA-A2/DR1
UCP3 (Godet et al., 2012)	GTAFVQMPAHGLFPW (SEQ ID NO: 38)		
UCP4 (Godet et al., 2012)	SLCYSILKAKNAGMS (SEQ ID NO: 39)		
429	RPIVNM DYV (SEQ ID NO: 40)	H2D ^b	C57/BL6J
660	HAQCPYGV L (SEQ ID NO: 41)	H2K ^b	C57/BL6J
1034	QAYRFHACVL (SEQ ID NO: 42)	H2K ^b	C57/BL6J
1021	QTVCTIN IYKI (SEQ ID NO: 43)	H2D ^b	C57/BL6J

Библиотека пептидов hTERT.

Лиофилизированные пептиды hTERT (чистота >70%) приобретали у GenScript (США). Этот набор состоит из 269 пептидов по 15 а.к. с перекрытием в 11 а.к. и охватывает всю последовательность белка hTERT из INVAC-1. Перед использованием каждый пептид ресуспендировали в дистиллированной воде при 2 мг/мл согласно рекомендациям поставщика и хранили в замороженном виде при -20°C. 27 пулов по 9-10 перекрывающихся пептидов hTERT (табл. 2) использовали для изучения широты реакций hTERT-специфичных Т-клеток методом ELISpot на IFN γ .

Таблица 2

Пулы перекрывающихся пептидов hTERT

P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12	P13	P14	P15	P16	P17	P18	P19	P20	P21	P22	P23	P24	P25	P26	P27
1	11	21	31	41	51	61	71	81	91	101	111	121	131	141	151	161	171	181	191	201	211	221	231	241	251	261
2	12	22	32	42	52	62	72	82	92	102	112	122	132	142	152	162	172	182	192	202	212	222	232	242	252	262
3	13	23	33	43	53	63	73	83	93	103	113	123	133	143	153	163	173	183	193	203	213	223	233	243	253	263
4	14	24	34	44	54	64	74	84	94	104	114	124	134	144	154	164	174	184	194	204	214	224	234	244	254	264
5	15	25	35	45	55	65	75	85	95	105	115	125	135	145	155	165	175	185	195	205	215	225	235	245	255	265
6	16	26	36	46	56	66	76	86	96	106	116	126	136	146	156	166	176	186	196	206	216	226	236	246	256	266
7	17	27	37	47	57	67	77	87	97	107	117	127	137	147	157	167	177	187	197	207	217	227	237	247	257	267
8	18	28	38	48	58	68	78	88	98	108	118	128	138	148	158	168	178	188	198	208	218	228	238	248	258	268
9	19	29	39	49	59	69	79	89	99	109	119	129	139	149	159	169	179	189	199	209	219	229	239	249	259	269
10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260	

Линия опухолевых клеток.

Линия опухолевых клеток Sarc-2, которая использовалась для оценки противоопухолевого эффекта INVAC-1, была получена из спонтанной фибросаркомы у мыши HLA-A2/DR3. Опухолевую массу диссоциировали в стерильных условиях и получали первичную суспензию клеток. Было показано, что эта линия клеток экспрессирует молекулу HLA-A*0201. Клетки культивировали в среде RPMI glutamax (Life Technologies) с добавлением 10% FBS (Life Technologies) и 1% пенициллина/стрептомицина.

Иммунизация мышей и процедура электропорации *in vivo*.

Интрадермальная (ID) иммунизация проводилась в нижней части боков мышей с помощью инсулиновых шприцов и специальных игл (U-100, 29GX1/2" - 0,33×12 мм, Terumo, Бельгия) после бритья. Ни после бритья, ни во время и после процедур иммунизации не наблюдалось никаких эритем. Внутримышечная (IM) иммунизация проводилась в передней части мышцы *tibialis cranialis*, также с помощью инсулиновых шприцов и специальных игл U-100. Подкожная (SC) иммунизация проводилась у основания хвоста, также с помощью инсулиновых шприцов и специальных игл U-100. Каждое животное получало первичную IM, ID или SC инъекцию плазмиды (INVAC-1, NTC, pUTD10Not, pUTD10Cog или pUTD23Тун), соответствующую 12,5, 25, 50, 100, 200, 400, 800 или 1200 мкг ДНК, либо 1×PBS, в зависимости от эксперимента. В соответствии с режимом вакцинации мыши могли получать аналогичную вторую или третью инъекцию ДНК либо 1×PBS.

Электропорация ДНК *in vivo* проводилась с помощью системы электропорации Cliniporator® 2 с программным обеспечением (IGEА, Италия), снабженной пластинчатыми электродами (Р-30-8G, IGEА). Непосредственно после ID или SC вакцинации, по месту инъекции делали кожную складку, полностью покрытую проводящим гелем (Labo FH, синий контактный гель, NM Médical, Франция), и помещали её между пластинчатыми электродами. Подавали два импульса различного напряжения (HV-LV): HV: 1250 В/см, 1 Гц, 100 мкс; 1 импульс, перерыв 1000 мс; LV: 180 В/см, 1 Гц, 400 мс, 1 импульс. Непосредственно после ГМ инъекции каждую мышцу полностью покрывали проводящим гелем и помещали между пластинчатыми электродами. Подавали два импульса различного напряжения (HV-LV): HV: 750 В/см, 1 Гц, 100 мкс, 1 импульс, перерыв 1000 мс; LV: 100 В/см, 1 Гц, 400 мс, 1 импульс.

В некоторых экспериментах, за 18 ч до вакцинации ДНК или одновременно с введением INVAC-1, мышам вводили ID 0,5 мкг мышинового GM-CSF или 1 нг мышинового IL-12 в конечном объеме 25 мкл на один бок. Оба цитокина приобретали у фирмы Miltenyi (Германия).

Метод ELISpot.

У иммунизированных мышей извлекали и размельчали селезенки, а клеточные суспензии фильтровали через нейлоновую сетку на 70 мм (Cell Strainer, BD Biosciences, Франция) для выделения спленоцитов. У иммунизированных мышей брали кровь путем ретроорбитальной пункции под анестезией для выделения мононуклеаров периферической крови (PBMC). Спленоциты или PBMC очищали на фиколле (Ficoll -среда для выделения лимфоцитов, Eurobio, Франция). Очищенные на фиколле лимфоциты из крови или селезенки подсчитывали на счетчике Cellometer® Auto T4 Plus (Ozyme, Франция).

Микропланшеты из PVDF для ELISpot (набор IFN γ Elispot, Diaclone, Abcys, Франция, № 862.031.010P) покрывали в течение ночи захватывающим антителом (против IFN- γ мыши) и блокировали 1 \times PBS с 2% молока. На планшеты вносили клеточные суспензии в трех повторах по 2 \times 10⁵ клеток на лунку и стимулировали приуроченными к HLA или H2 производными пептидов hTERT при 5 мкг/мл в бессывороточной культуральной среде или с помощью PMA-иономицина (0,1 и 1 мкМ соответственно). Через 19 ч пятна проявляли с помощью конъюгированного с биотином детектирующего антитела с последующим раствором стрептавидина-AP и субстрата BCIP/NBT. Пятна подсчитывали на счетчике Immunospot ELISpot с программным обеспечением (CTL, Германия). При анализе данных по ELISpot вакцинированные животные считались восприимчивыми, если частота пятен, соответствующих hTERT-специфичным Т-клеткам CD8 или CD4, превышала порог отсечения в 10 пятен.

Анализ на цитотоксичность *in vivo*.

Для получения клеток-мишеней, спленоциты из наивных мышей HLA-B7 метили раствором 1 \times PBS, содержащим высокую (5 мкМ), среднюю (1 мкМ) или низкую (0,2 мкМ) концентрацию CFSE (набор клеточных индикаторов Vybrant CFDA-SE; Life Technologies, Saint-Aubin, Франция). Наивные спленоциты, меченные при 5 и 1 мкМ CFSE, обрабатывали 2 различными пептидами HLA-B7, 1123 и 351, соответственно, при 5 мкг/мл в течение 1,5 ч при комнатной температуре. Спленоциты, меченные при низком уровне CFSE, оставляли необработанными. Через 14 дней после первой (прайм) или через 10 дней после повторной (буст) инъекции каждая мышь, ранее вакцинированная INVAC-1 или 1 \times PBS, получала 10⁷ меченных CFSE клеток из смеси, содержащей равное число клеток из каждой фракции, через ретроорбитальную вену. Через 15-18 ч, суспензии одиночных клеток из селезенок анализировали методом проточной цитометрии на проточном цитометре Macsquant® (Miltenyi, Германия).

Исчезновение обработанных пептидами клеток определяли путем сравнения соотношения обработанных (высокая/средняя интенсивность флуоресценции CFSE) и необработанных (низкая интенсивность флуоресценции CFSE) популяций у иммунизированных INVAC-1 мышей по сравнению с контрольными (1 \times PBS) мышами. Процент специфической гибели на 1 подопытное животное определяли по следующей формуле:

$$\left[\frac{\text{CFSE}_{\text{низкая PBS}} / \text{CFSE}_{\text{высокая/средняя PBS}}}{\text{CFSE}_{\text{низкая пДНК}} / \text{CFSE}_{\text{высокая/средняя пДНК}}} \right] \times 100 \quad \text{[среднее]}$$

Анализ связывания цитокинов.

Спленоциты (6 \times 10⁵ клеток) из вакцинированных мышей HLA-A2/DR1 культивировали 24 ч при 37°C с приуроченными к HLA-DR производными пептидами hTERT (578, 904 и 1029) при 5 мкг/мл. Собирали супернатанты культур с цитокинами и хранили в замороженном виде при -20°C до определения. Концентрации IL-2, IFN γ , TNF α , IL-4, IL-6, IL-17A и IL-10, соответственно, определяли с помощью коммерчески доступного набора - набора Mouse Th1/Th2/Th17 Cytometric Beads Array (CBA, BD Biosciences). Иммуноанализ CBA проводили согласно инструкциям изготовителя.

Проточную цитометрию проводили на проточном цитометре FACScan LSR II (BD Biosciences); анализ данных проводили с помощью программы FCAP Array™ Software версии 3.0 (BD Biosciences).

Противоопухолевый эффект *in vivo*.

Для экспериментов по терапевтической вакцинации 24-недельным мышам HLA-A2/DR1 подкожно прививали 2 \times 10⁴ клеток Sarc-2 в правый бок брюшной стенки. Затем животных иммунизировали с помощью ДНК-вакцин внутривенно с последующей электропорацией, как описано выше, через 4, 21 и

35 дней после прививания. Через каждые 2-3 дня отмечали рост опухолей с помощью штангенциркуля. Также через каждые 2-3 дня отмечали вес мышей. Мышей забивали, когда опухоли достигали 2000 мм³. Следовали рекомендациям по содержанию и использованию животных при исследовании рака, особенно насчет выявления клинических признаков, требующих немедленного вмешательства (Workman et al., 2010, VJC). Объем опухолей рассчитывали по следующей формуле: $(L \times l^2)/2$. Результаты выражали в мм³ (L = длина; l = ширина).

Для профилактической вакцинации 5-10-недельных мышей HLA-A2/DR1 подвергали вакцинации дважды (в дни 0 и 21), как описано выше. Через 32 дня после последней иммунизации животным подкожно прививали 5×10^4 клеток Sarc-2. Через каждые 2-3 дня отмечали вес мышей и рост опухолей, как описано выше. Мышей забивали, когда опухоли достигали 2000 мм³.

В качестве критерия оценки эффективности вакцин использовали замедление роста опухолей (TGD). При этом сравнивается время до достижения заданного объема опухолей (500 мм³) в контрольной и опытной группе.

Статистический анализ и обработка данных.

Для обработки, анализа и графического представления данных использовали программу Prism-5. Данные представлены в виде среднего \pm стандартное отклонение или в виде медианы. Статистический анализ данных ELISpot проводили с помощью непараметрического теста Манна-Уитни и/или анализа по Краскел-Уоллис с критерием Данна для множественных сравнений. Значимость устанавливали по значению $p < 0,05$.

Результаты.

Характеристика и анализ последовательности ДНК плазмиды INVAC-1.

Трансген Ubi-hTERT был успешно вставлен в pNTC 8685-eRNA41H-HindIII-XbaI, как показало рестрикционное картирование с помощью различных рестрикционных эндонуклеаз (фиг. 1A и 1B). Образовавшийся вектор pNTC8685-eRNA41H-HindIII-XbaI-Ubi-hTERT (INVAC-1) также частично просеквенировали на стыках с помощью праймеров pVAC5' и pVAC3'. Последовательности подтвердили, что процесс клонирования был успешным.

Полномасштабное секвенирование плазмиды INVAC-1 проводили на материале плазмиды из Master Cell Bank (SEQ ID NO: 11 и фиг. 16). Результат соответствовал ожидаемой последовательности, за исключением одного нуклеотида. Так, это полное секвенирование выявило молчащую мутацию (G6064C; глицин GGG на глицин GGC) по сравнению с геном теломеразы человека, фигурирующим в базах данных (номер доступа NM_198253). Эта молчащая мутация может рассматриваться как дополнительная сигнатура INVAC-1, так как эта замена основания разрушает уникальный сайт BamHI (GGATCC на GCATCC), представленный в гене теломеразы дикого типа.

Характеристика и анализ последовательностей производных конструкций INVAC-1.

Были синтезированы и клонированы три ДНК-плазмиды - производные INVAC-1, экспрессирующие различные слитые белки Ubi-hTERT (фиг. 2A). Все трансгены Ubi-hTERT были успешно лигированы в экспрессирующий вектор pcDNA3.1(+) от Invitrogen, как показало расщепление HindIII и XbaI и электрофорез (фиг. 2B). Вставки и стыки секвенировали с помощью праймеров PEGFP-N5' и BGH, соответствующих последовательностям вектора, фланкирующим ДНК вставки. Результаты секвенирования подтвердили, что трансгены были клонированы правильно (SEQ ID NO: 13, 15, 17 и фиг. 17-19).

Белки INVAC-1 и производных INVAC-1 правильно экспрессируются *in vitro* и подвергаются деградации в протеасомном пути.

Проводили анализ вестерн-блот, чтобы получить информацию о глобальной экспрессии белков hTERT дикого типа, INVAC-1 и производных INVAC-1 от 18 до 96 ч после краткосрочной трансфекции *in vitro* в клетки линии HEK293T и CrFK. Полосы белка hTERT дикого типа соответствовали размеру немодифицированного hTERT в 124,5 кДа (фиг. 3A и 3B, слева). Экспрессия белка hTERT дикого типа оказалась стабильной по времени, особенно в клетках HEK293T. Напротив, белки INVAC-1 (фиг. 3A и 3B, справа и фиг. 3C, сверху) и производных INVAC-1 (фиг. 3C, снизу) быстро подвергались деградации с течением времени.

В отличие от hTERT дикого типа (pTRIP-CMV-hTERT), конструкция INVAC-1 давала две отдельные полосы: слабую верхнюю полосу, соответствующую слитому белку Ubi-hTERT ожидаемого размера в 127,4 кДа, и нижнюю полосу, соответствующую кодируемому INVAC-1 белку hTERT без полипептида убиквитина (119 кДа). Эти две формы кодируемого INVAC-1 белка hTERT обнаруживались в обеих линиях клеток, HEK293T и CrFK (фиг. 3A и 3B). Такая же картина наблюдалась у конструкций производных INVAC-1, $\Delta 10$ Not, $\Delta 10$ Cog и A23 (фиг. 3C). В целом более слабая экспрессия белков INVAC-1 и производных INVAC-1 по сравнению с hTERT дикого типа, их профили экспрессии и их кинетика исчезновения по времени свидетельствуют, что эти белки быстро подвергаются деградации в убиквитин-зависимом протеасомном пути в соответствии с предложенной моделью деградации слитых с убиквитином белков (Bachmair, 1986). Быстрое появление полосы INVAC-1 в 119 кДа указывает на то, что большая или почти большая часть белка котрансляционно расщепляется убиквитин-специфичными протеазами процессинга на стыке Ubi-hTERT. Следовательно, белок вступает на путь быстрой протеасом-

зависимой деградации в соответствии с так называемым правилом N-конца для деградации белков (Tasaki, 2012; Varshavsky, 1996).

Эти результаты подтверждают профиль экспрессии *in vitro* и идентичность слитых белков Ubi-hTERT, кодируемых INVAC-1 и производными INVAC-1. Полипептид убиквитина, слитый с производными белками hTERT, играет свою роль путем усиления деградации белков в соответствии с правилом N-конца. В соответствии с этим правилом N-конца, белок hTERT становится нестабильным и быстро подвергается деградации системой протеасом, участвующей в продукции пептидов для презентации антигенов молекулами главного комплекса гистосовместимости (МНС) класса I (Cadima-Couto, 2009; Michalek et al., 1993). Таким образом, эти данные указывают на то, что слитые конструкции Ubi-hTERT, которые подвергаются усиленной деградации в клетках тканевых культур млекопитающих, также могут быстро подвергаться деградации *in vivo* и эффективно индуцировать большие ответы Т-клеток CD8⁺, чем hTERT дикого типа.

Белок INVAC-1 имеет преимущественно цитоплазматическое распределение и профиль исключения из ядрышек.

С целью делегализации происходящего из INVAC-1 белка hTERT для усиления его деградации удаляли сигнал ядрышковой локализации (N-концевую часть hTERT). При этом клеточную локализацию hTERT, кодируемого INVAC-1, определяли методом иммунофлуоресцентного анализа после трансфекции в клетки линии CrFK, HEK293, HeLa, QT6 (фиг. 4).

Было показано, что hTERT дикого типа (pTRIP-CMV-hTERT) преимущественно локализуется в ядре и ядрышках в трансфицированных клетках HEK293T через 24 ч (фиг. 4A). Напротив, белок INVAC-1 распределялся между ядром и цитоплазмой, проявляя, прежде всего, четкое исключение из ядрышек (фиг. 4A). Временная трансфекция плазмид hTERT дикого типа (pTRIP-CMV-hTERT) и INVAC-1 в клетки HeLa давала аналогичный профиль локализации через 24 и 48 ч после трансфекции для обоих белков (фиг. 4B).

Слабый сигнал флуоресценции анти-hTERT, который наблюдался в клетках.

HEK293T и HeLa после трансфекции пустым каркасом вектора pNTC8685-eRNA41H, вероятно, обусловлен перекрестной реактивностью с эндогенным hTERT.

Чтобы избежать неспецифической фоновой флуоресценции из-за экспрессии эндогенного белка hTERT, использовали для иммуноокрашивания клеточные линии не человека, а фибросаркомы QT6 перепела и почечных клеток CrFK кошки. В обеих линиях клеток не наблюдалось никаких фоновых сигналов после краткосрочной трансфекции пустым каркасом вектора pNTC8685-eRNA41H (фиг. 4C и 4D). Как и ожидалось, экзогенный белок hTERT дикого типа (pTRIP-CMV-hTERT) в основном обнаруживался в ядре и ядрышках обеих клеточных линий (фиг. 4C и 4D). Белок INVAC-1, как уже отмечалось в клетках HEK293T и HeLa, в клетках CrFK через 24 ч распределялся в ядре и цитоплазме (фиг. 4D). Интересно, что экспрессия INVAC-1 в клетках QT6 через 24 и 48 ч была только цитоплазматической, свидетельствуя, что удаление сигнала ядрышковой локализации сильно изменило распределение белка в этой линии клеток.

В целом эти результаты показали, что происходящий из INVAC-1 белок hTERT имеет модифицированное субклеточное распределение по сравнению с hTERT дикого типа в различных клеточных линиях. Это изменение может давать преимущество типа усиления протеасомной деградации белка на пептиды для презентации с МНС класса I при выработке специфических клеточных иммунных реакций (Andersson and Barry, 2004).

Трансфекция клеток QT6 и CrFK (без неспецифического фона hTERT) с помощью производных INVAC-1 (pUTD10Not, pUTD10Cog и pUTD23Tun) подтвердила картину исключения из ядрышек этих производных белков hTERT (данные не приводятся). Их субклеточное распределение было в основном цитоплазматическим по сравнению с hTERT дикого типа.

INVAC-1 и производные INVAC-1 не обладают ферментативной активностью.

Теломераза у человека играет решающую роль в росте опухолей тем, что она участвует в иммортализации и предотвращении старения опухолевых клеток. Следовательно, использование теломеразы дикого типа в качестве вакцинного продукта может вызывать проблемы с безопасностью.

Для оценки теломеразной активности у конструкций Ubi-hTERT в отрицательной по теломеразе линии клеток CrFK проводили анализ TRAP. Активность теломеразы выявлялась только в клетках CrFK, трансфицированных hTERT дикого типа с помощью плазмиды pTRIP-CMV-hTERT. Теломеразная активность не обнаруживалась в клетках CrFK, трансфицированных INVAC-1 или производными INVAC-1 (фиг. 5).

Как видно из фиг. 5A и 5C, необработанные данные по поглощению показывают, что уровень теломеразной активности у INVAC-1 и производных INVAC-1 сравним с её уровнем в необработанных клетках.

Данные по относительной теломеразной активности (RTA) (фиг. 5B и 5D), которые представляют полностью обработанные результаты с учетом специфичности анализа с использованием различных отрицательных контролей, включая инактивированные нагреванием образцы, показывают, что INVAC-1 и производные INVAC-1 полностью лишены какой бы то ни было теломеразной активности.

Все образцы, обработанные контролем на амплификацию внутреннего стандарта (IS), оказались очень положительными, что подтверждает отсутствие ингибиторов ДНК-полимеразы Taq в образцах лизатов CrFK и тем самым подчеркивает специфичность метода.

В заключение, эти результаты подтверждают, что INVAC-1 и производные INVAC-1 не обладают ферментативной активностью. Следовательно, в отношении теломеразной активности не должно быть проблем с безопасностью при использовании INVAC-1 на людях.

Электропорация полезна для получения значительных уровней hTERT-специфичных Т-клеток CD8, секретирующих интерферон- γ , после ID введения INVAC-1

Оценивали интенсивность реакций hTERT-специфичных Т-клеток CD8 у мышей C57BL/6, ранее иммунизированных INVAC-1 внутрикожно с последующей электропорацией кожи или без неё (фиг. 6). Через 14 дней после инъекции у мышей брали селезенки и измеряли индуцированные иммунные реакции методом ELISpot на IFN- γ , используя пептиды hTERT, рестрицированные H2. Наблюдалось значительное различие в частоте Т-клеток CD8 IFN γ ⁺ между группой мышей, получавших электропорацию после ID инъекции INVAC-1, и группой, которая не получала ($p < 0,05$). Таким образом, эти результаты свидетельствуют, что электропорация полезна для получения значительных уровней реакции hTERT-специфичных Т-клеток CD8 после ID-вакцинации с помощью INVAC-1.

Вакцинация с INVAC-1 различными способами введения с последующей электропорацией индуцирует hTERT-специфичные Т-клетки CD8, секретирующие интерферон- γ . Наилучшим способом вакцинации представляется ID-вакцинация

Стандартные вакцины обычно вводятся подкожно (SC) или внутримышечно (IM). Однако сейчас в области вакцинации возрастает интерес к интрадермальному (ID) способу иммунизации (Combadiere and Liard, 2011). Поэтому тестировали способ ID для введения INVAC-1 и сравнивали с обычными способами SC и IM.

В первой серии экспериментов различные группы трансгенных мышей HLA-B7.

иммунизировали INVAC-1 способом ID или SC с последующей сразу же электропорацией (фиг. 7A). Через 14 дней после вакцинации/электропорации у мышей брали селезенки и измеряли индуцированные иммунные реакции методом ELISpot на IFN- γ , используя пептиды hTERT, рестрицированные HLA-B7. Во второй серии экспериментов одну группу трансгенных мышей HLA-B7 иммунизировали INVAC-1 способом ID, а другую - способом IM с последующей сразу же электропорацией (фиг. 7B). Определяли частоту hTERT-специфичных Т-клеток CD8 в PBMCs методом ELISpot на IFN- γ , используя пептиды hTERT, рестрицированные HLA-B7. Было установлено, что вакцинация с помощью INVAC-1 с последующей электропорацией способна индуцировать hTERT - специфичные реакции Т-клеток CD8 у мышей HLA-B7 независимо от способа вакцинации (фиг. 7A и 7B).

Кроме того, как видно из фиг. 7A, количество восприимчивых животных было выше в группе мышей, вакцинированных способом ID, по сравнению с группой, вакцинированной способом SC, при 6 из 8 против 3 из 8 восприимчивых, соответственно. Существенное различие наблюдалось также в частоте hTERT-специфичных Т-клеток CD8 между группой мышей, вакцинированных ID, в сравнении с животными, вакцинированными IM ($p < 0,05$) (фиг. 7B).

Оба эксперимента показали, что способ ID вакцинации более эффективен, чем способы IM и SC для опосредованной INVAC-1 индукции hTERT-специфичных Т-клеток CD8. Аналогичные данные были получены на других моделях у мышей, т.е. на мышах HLA-A2-DR1 (данные не приводятся). Поэтому все последующие исследования по иммуногенности с INVAC-1 планировались при ID введении вакцины с последующей электропорацией.

Влияние дозы вакцины на hTERT-специфичные реакции Т-клеток CD8 после однократной ID-иммунизации с помощью INVAC-1 и электропорации.

Другим важным параметром для изучения является влияние дозы вакцины на hTERT-специфичные реакции Т-клеток CD8. Мышей C57BL/6 иммунизировали способом ID с последующей электропорацией в оба нижних бока при возрастающих дозах INVAC-1. Объем вакцины оставался неизменным на уровне 50 мкл на одно место. Животных вакцинировали в двух или четырех местах в зависимости от конечной дозы вакцины. Через 14 дней после вакцинации/электропорации у мышей брали селезенки и измеряли специфические клеточные иммунные реакции методом ELISpot на IFN- γ , используя пептиды hTERT, рестрицированные H2.

В первой серии экспериментов мыши C57BL/6 получали однократную ID инъекцию INVAC-1 с электропорацией в дозах от 12,5 до 100 мкг (фиг. 8A).

Наблюдалось значительное различие по частоте hTERT-специфичных Т-клеток CD8 в группе животных, вакцинированных 100 мкг INVAC-1, по сравнению с контрольными животными, вакцинированными PBS ($p < 0,01$) (фиг. 8A). Также отмечалось, что среднее число hTERT-специфичных Т-клеток CD8 возрастало пропорционально полученной дозе вакцины (от 12,5 мкг до 100 мкг). Число восприимчивых животных также возрастало вместе с дозой вакцины при 4 восприимчивых из 6 для дозы 12,5 мкг, 4 из 5 для дозы 25 мкг и 6 восприимчивых из 6 для доз 50 и 100 мкг соответственно.

Во второй серии экспериментов мыши C57BL/6 получали однократную ID инъекцию INVAC-1 с электропорацией в дозах от 100 мкг до 1200 мкг (фиг. 8B). Наблюдалось значительное различие по частоте hTERT-специфичных Т-клеток CD8 в группе животных, вакцинированных 800 мкг INVAC-1 при введении в виде 4 мг/мл по сравнению с контрольными животными, вакцинированными PBS ($p < 0,05$) (фиг. 8B). Отмечалось, что среднее число hTERT-специфичных Т-клеток CD8 возрастало пропорционально полученной дозе вакцины от 100 мкг до 800 мкг, причем это среднее число уменьшалось при введении 1200 мкг. Число восприимчивых животных возрастало вместе с дозой вакцины при 4 восприимчивых из 5 для дозы 100 мкг, 5 восприимчивых из 5 или 4 из 4 для доз свыше 200 мкг, соответственно. При дозе в 1200 мкг, даже если все животные были восприимчивы, то все-таки у 2 из 5 животных уровень специфических реакций был близким к порогу отсечения.

В заключение, по критерию специфичных к вакцине Т-клеток CD8 у мышей C57BL/6, наблюдалась зависимость типа "доза-ответ" в результате введения различных количеств INVAC-1. Интересно, что не наблюдалось никаких признаков токсичности вакцины у животных, получавших самые высокие дозы вакцины (800 и 1200 мкг), при сравнении с контрольными мышами (отмечали вес тела и макроскопическую картину при вскрытии). Аналогичные данные были получены на трансгенных мышах HLA-B7 (данные не приводятся).

Для вакцинации INVAC-1 рекомендуется режим прайм-буст с целью повышения уровня hTERT-специфичной реакции Т-клеток CD8.

Большинство протоколов вакцинации, рекомендуемых для традиционных вакцин (БЦЖ, корь, грипп, ...), включают режим прайм-буст с тем, чтобы улучшить частоту специфичных к вакцине иммунных реакций. Поэтому исследовали влияние режима прайм-буст на выработку hTERT-специфичных реакций Т-клеток CD8 при ID-вакцинации с INVAC-1 и электропорацией. С этой целью трансгенных мышей HLA-B7 иммунизировали ID с помощью INVAC-1, а места вакцинации на коже подвергали электропорации сразу же после введения вакцины. Через 21 день после первой иммунизации мыши получали вторую инъекцию INVAC-1 по такой же процедуре вакцинации. В различные моменты времени после первичной (прайм) и повторной (буст) иммунизации брали периферическую кровь для измерения hTERT-специфичных реакций Т-клеток CD8 методом ELISpot на IFN- γ , используя пептиды hTERT, рестрицированные HLA-B7 (фиг. 9). Пик hTERT-специфичной реакции Т-клеток CD8 наблюдался через 14 дней после прайминга. Однако средняя частота hTERT-специфичных Т-клеток CD8 в группе вакцинированных животных была сравнительно низкой (11,3 пятен на 200000 PBMCs), при этом 2 из 5 животных не реагировали на вакцину. После бустинга пик hTERT-специфичных Т-клеток CD8 наблюдался на 10-й день после инъекции. Средняя частота hTERT-специфичных Т-клеток CD8 в группе вакцинированных животных в это время (D31 после прайминга, D10 после бустинга) существенно отличалась от средней частоты hTERT-специфичных Т-клеток CD8 в неиммунизированных образцах ($p < 0,05$). После бустинга 4 из 5 животных были восприимчивыми.

В заключение, для ID-вакцинации INVAC-1 с электропорацией рекомендуется режим вакцинации прайм-буст, потому что, во-первых, он позволяет повысить частоту hTERT-специфичных Т-клеток CD8, циркулирующих в крови (эффektorные Т-клетки), а во-вторых, сокращает время, необходимое для достижения пика специфического клеточного иммунного ответа, что является важным параметром в контексте вакцинации против рака.

ID-вакцинация с помощью конструкций $\Delta 10\text{Not}$, $\Delta 10\text{Cog}$ или $\Delta 23$ с последующей электропорацией также индуцирует hTERT-специфичную реакцию Т-клеток CD8. Для повышения частоты специфичных к вакцине Т-клеток CD8 рекомендуется режим прайм-буст.

Вместе с разработкой INVAC-1 разрабатывали еще 3 другие конструкции ДНК-плазмид (производных INVAC-1): $\Delta 10\text{Not}$ (pUTD10Not), $\Delta 10\text{Cog}$ (pUTD10Cog) или $\Delta 23$ (pUTD23Tyn). В каталитическом сайте фермента hTERT были устроены три делеции. Они составляли 10-23 аминокислотных остатка и охватывали важнейшее трио остатков валин-аспарагиновая кислота-аспарагиновая кислота (Val-Asp-Asp, или VDD в однобуквенной кодировке) (фиг. 2A). Эти конструкции разрабатывали с тем, чтобы показать, что любые делеции, устраняющие активность фермента, могут сохранять иммуногенность.

Для проверки этой гипотезы мышей C57BL/6 иммунизировали способом ID с последующей электропорацией с помощью INVAC-1, $\Delta 10\text{Not}$, $\Delta 10\text{Cog}$, $\Delta 23$ или PBS (фиг. 10A). Половина животных получала вторую инъекцию ДНК или PBS через 21 день после первой иммунизации по такой же процедуре. Животных забивали через 14 дней (группа мышей, получавшая однократную инъекцию) или 10 дней (группа мышей, получавшая две инъекции) после последней вакцинации/электропорации. У мышей брали селезенки и измеряли индуцированные Т-клеточные ответы CD8 методом ELISpot на IFN- γ , используя пептиды hTERT, рестрицированные H2 (пул из четырех пептидов).

У животных, получавших однократную инъекцию ДНК, существенное отличие по частоте hTERT-специфичных Т-клеток CD8 наблюдалось только в группе мышей, вакцинированных 100 мкг INVAC-1, по сравнению с контрольными животными, вакцинированными PBS ($p < 0,05$) (фиг. 10A, темные точки). При анализе частоты восприимчивых 3 из 4 были восприимчивы в группах мышей, вакцинированных INVAC-1 и $\Delta 10\text{Cog}$. Однако животные с $\Delta 10\text{Cog}$ были слабо восприимчивы при менее 50 hTERT-

специфичных ответов Т-клеток CD8 на 200000 спленоцитов. В группе животных, вакцинированных A23, только 1 из 4 было восприимчивым, и их совсем не было среди животных, обработанных $\Delta 10Not$. У животных, получавших две вакцинации (фиг. 10А, белые точки), наблюдалась значительная средняя частота hTERT-специфичных Т-клеток CD8, секретирующих IFN- γ , в селезенке мышей, иммунизированных INVAC-1, $\Delta 10Not$ и $\Delta 10Cog$, по сравнению с контрольными мышами, получавшими PBS ($p < 0,001$). Только 2 из 4 животных были восприимчивы в группе мышей, вакцинированных $\Delta 23$, что не было статистически значимо. В заключение, после одного или двух циклов вакцинации, конструкции INVAC-1 и производных INVAC-1 вызывали появление hTERT-специфичных Т-клеток CD8, причем INVAC-1 был более иммуногенным на мышах C57BL/6.

Во второй серии экспериментов, трансгенных мышей HLA-B7 вакцинировали ID с помощью INVAC-1, $\Delta 10Not$, $\Delta 10Cog$, A23 или PBS (фиг. 10В) с последующей электропорацией и делали вторую инъекцию через 21 день после первой по такой же процедуре. Через 10 дней после последней инъекции у мышей брали селезенки и измеряли индуцированные Т-клеточные ответы CD8 методом ELISpot на IFN- γ , используя пептиды hTERT, рестрицированные B7. Как видно из фиг. 10В, наблюдалась значительная средняя частота hTERT-специфичных Т-клеток CD8, секретирующих IFN- γ , в селезенке мышей, иммунизированных INVAC-1, $\Delta 10Not$, $\Delta 10Cog$ и $\Delta 23$, по сравнению с контрольными мышами, получавшими PBS ($p < 0,001$).

Как показано для INVAC-1, 3 производные INVAC-1 - $\Delta 10Not$, $\Delta 10Cog$ и $\Delta 23$ также оказались способными индуцировать hTERT-специфичные Т-клетки CD8 *in vivo* после ID-вакцинации и электропорации у двух разных штаммов мышей. Для производных INVAC-1 также рекомендуется режим вакцинации прайм-буст для достижения значительных уровней реакции hTERT-специфичных Т-клеток CD8. В целом эти результаты показывают, что именно INVAC-1 является той конструкцией, которая наилучшим образом индуцирует hTERT-специфичные реакции Т-клеток CD8. Вероятно, это вызвано наблюдавшимися различиями в уровне экспрессии белков AhTERT после плазмидной трансфекции, как это видно при вестерн-блоттинге (фиг. 3).

Широта реакции hTERT-специфичных Т-клеток после ID-вакцинации с последующей электропорацией различается в зависимости от конструкции плазмиды с hTERT, используемой для вакцинации (INVAC-1, pNTC-hTERT или pNTC-hTERT- ΔVDD).

Оценивали влияние модификаций последовательности hTERT, устроенных в конструкции INVAC-1, а именно: (1) удаление сигнала ядрышковой локализации, (2) добавление последовательности убиквитина и (3) делеции в пределах каталитического сайта, на репертуар Т-клеточного иммунного ответа против hTERT. Изучали hTERT-специфичные клеточные иммунные реакции на INVAC-1 после ID-иммунизации с электропорацией INVAC-1 и сравнивали с ответами, вызванными ДНК, кодирующей нативную последовательность TERT дикого типа человека (pNTC-hTERT), и ДНК, кодирующей последовательность hTERT с делецией только лишь участка VDD (pNTC-hTERT- ΔVDD). Контрольные животные получали инъекции ID по 25 мкг пустого вектора pNTC с последующей электропорацией.

Первая серия трансгенных мышей HLA-B7 получала однократную инъекцию какой-либо одной из 4 конструкций по протоколу вакцинации, описанному выше (25 мкг на 1 мышь). Вторая серия животных получала первичную инъекцию (прайм) и повторную (буст) через 21 день после первой вакцинации любой одной из 4 конструкций какой-либо одной из 4 конструкций по протоколу вакцинации, описанному выше (25 мкг на 1 мышь).

Через 14 дней после однократной инъекции или через 10 дней после повторной (буст) исследовали спленоциты от вакцинированных и контрольных мышей методом ELISpot на IFN γ , используя 269 пептидов в 15 а.к. с перекрытием по 11 а.к., охватывающих всю последовательность белка hTERT (27 пулов по 10 пептидов каждый).

Иммунизация с INVAC-1 индуцировала большой Т-клеточный репертуар против многочисленных эпитопов hTERT, поскольку после прайминга распознавалось около 12 пулов пептидов (фиг. 11А). Эти данные свидетельствуют о том, что после процессинга на поверхности дендритных клеток экспрессировалось как минимум 12 эпитопов, приуроченных к HLA-B7, с такой плотностью комплексов МНС-пептид, которая позволяет индуцировать сильный Т-клеточный ответ. Эти важные результаты свидетельствуют о способности INVAC-1 к процессингу и экспрессии многочисленных пептидов hTERT на поверхности APC. Отличия, полученные с другими конструкциями (hTERT и hTERT ΔVDD), подтверждают, что особенности оптимизации, сделанной на INVAC-1, приводят к увеличению широты репертуара Т-клеток против hTERT. Кроме того, эти результаты подчеркивают преимущество ДНК-вакцинации перед пептидной иммунизацией.

В данном исследовании подтвердилось преимущество второго цикла иммунизации (prime-буст) с INVAC-1 на трансгенных мышах. Улучшался Т-клеточный репертуар *in vivo*, поскольку выявлялось по меньшей мере 5 новых эпитопов (фиг. 11В). В общей сложности после бустинга распознавалось как минимум 17 эпитопов. Эти данные подтверждают, что несколько инъекций пациенту будут полезны для получения лучшего противоопухолевого ответа.

При глобальном анализе этих данных путем суммирования общей средней частоты специфических Т-клеток, выявленных для 27 пулов пептидов, не обнаружилось никаких значительных отличий после одного (прайм) или двух (prime-буст) циклов иммунизации между тремя конструкциями hTERT (фиг. 11С). Это свидетельствует, что модификации, внесенные в INVAC-1 hTERT, не оказывали влияния на широту иммунного ответа, даже если наблюдался значительно более высокий опосредованный Т-клетками иммунный ответ после бустинга с помощью INVAC-1.

В заключение, вакцинация с помощью INVAC-1 индуцирует большой репертуар Т-клеточных иммунных ответов против многочисленных эпитопов hTERT, отличных от hTERT дикого типа и конструкций hTERTΔVDD, в смысле пептидов/эпитопов, распознаваемых Т-клетками.

ID-вакцинация с помощью INVAC-1 с последующей электропорацией индуцирует hTERT-специфичные Т-клеточные реакции с отличительными признаками иммунного ответа против рака: цитотоксическими Т-клетками CD8 и Т-клетками Th1 CD4

Среди иммунных клеток, имеющих существенное значение в противоопухолевых иммунных реакциях, цитотоксические Т-лимфоциты (CTL) CD8 и Т-клетки Th1 CD4 были идентифицированы как наиболее сильные эффекторные клетки (Vesely et al., 2011; Braumuller et al., 2013).

На первом этапе, исследовали цитотоксическую активность hTERT-специфичных Т-клеток CD8 *in vivo* после ID-вакцинации/электропорации с INVAC-1. Действительно, эта активность необходима для уничтожения раковых клеток. Для того чтобы измерить *in vivo* цитолитическую мощность ответа hTERT-специфичных Т-клеток CD8⁺, вызванного иммунизацией с INVAC-1, проводили анализ на цитотоксичность *in vivo*, используя меченные сукцинимидиловым эфиром карбоксифлуоресцеин-диацетата (CFSE) и обработанные пептидами спленоциты в качестве клеток мишени. Трансгенным мышам HLA-B7, получавшим ранее вакцинацию типа prime или prime-буст с помощью INVAC-1 (или PBS в качестве контроля) способом ID, как описано выше, вводили внутривенно 7×10^6 клеток мишени. Клетками мишени служили спленоциты от наивных конгенных мышей, меченные независимо друг от друга при трех различных концентрациях CFSE и либо обработанные пептидами hTERT, приуроченными к HLA-B7 (p351, иммунодоминантный пептид, или p1123, субдоминантный пептид), либо оставленные необработанными в качестве внутреннего контроля. Через 15-18 ч собирали клетки селезенки и определяли исчезновение обработанных пептидами клеток у иммунизированных мышей в сравнении с контрольными методом проточной цитометрии.

Результаты показывают, что у всех мышей вырабатывались специфические CTLs против иммунодоминантного пептида p351 после однократной инъекции (фиг. 12А, белые точки) со средним уровнем специфического лизиса в 35%. У одной трети животных вырабатывались специфические CTLs против субдоминантного пептида p1123 (фиг. 12А, черные точки). Можно ожидать, что при многократных циклах инъекций будет возрастать количество животных, у которых возникает специфический лизис CTLs против субдоминантного пептида p1123.

Недавно сообщалось, что hTERT-специфичный ответ Т-клеток CD4 может быть связан с лучшей реакцией на химиотерапию у пациентов с NSCLC (Godet et al., 2012). Поэтому исследовали наличие hTERT-специфичного ответа Т-клеток CD4 после ID инъекции INVAC-1. С этой целью трансгенных мышей HLA-A2/DR1 иммунизировали ID с INVAC-1 с последующей электропорацией и измеряли hTERT-специфичный ответ Т-клеток CD4 в селезенке через 14 дней после вакцинации методом ELISpot на IFN-γ, используя пептиды hTERT, рестрицированные DR1. Как видно из фиг. 12В, наблюдалась значительная средняя частота hTERT-специфичных Т-клеток CD4, секретирующих IFN-γ, в селезенке ID-вакцинированных мышей по сравнению с контрольными мышами, получавшими PBS ($p < 0,001$).

Уже подчеркивалось, что Th1-иммунитет оказывает четкое положительное действие на элиминацию раковых клеток *in vivo* (Braumuller et al., 2013). Так, Th1-клетки CD4⁺ вырабатывают несколько цитокинов (как-то IFN-γ, TNF-α и IL-2), необходимых для индукции клеточного иммунитета против опухолей. Поэтому, после ID-вакцинации с INVAC-1, исследовали различные цитокины, секретируемые hTERT-специфичными Т-клетками CD4. С этой целью спленоциты из вакцинированных INVAC-1 трансгенных мышей HLA-A2/DR1 стимулировали *in vitro* в течение 24 ч пулом пептидов hTERT или оставляли без стимуляции. Выделяли супернатанты и анализировали их на связывание цитокинов (СВА), чтобы определить концентрацию цитокинов Th1, Th2 и Th17, секретируемых hTERT-специфичными Т-клетками CD4.

Как видно из фиг. 12С, наблюдались значительные концентрации Th1-цитокинов IL-2, TNFα и IFNγ в супернатантах от спленоцитов, выделенных из мышей, вакцинированных INVAC-1, по сравнению с супернатантами от контрольных мышей ($p < 0,05$).

Таким образом, ID-вакцинация/электропорация с INVAC-1 способна усиливать экспансию hTERT-специфичных Т-клеток CD8, обладающих цитотоксической активностью *in vivo*, наряду со специфичными Т-клетками CD4 с профилем Th1. Оба типа ответов являются отличительным признаком хорошего иммунного ответа против рака.

Терапевтическая и профилактическая ID-вакцинация с помощью INVAC-1 с последующей электропорацией замедляет рост опухолей после инокуляции сингенных опухолей у трансгенных мышей

HLA-A2/DR1

Вплоть до этого момента, результаты показывали, что ID-инъекция INVAC-1 с последующей электропорацией способна индуцировать цитотоксические Т-клетки CD8 и Т-клетки Th1 CD4 у мышей. Следующим этапом была оценка степени защиты трансгенных мышей HLA-A2/DR1 при ID-вакцинации с INVAC-1 и электропорации после инокуляции опухолевых клеток Sarc-2 (фибросаркома). В первых опытах трансгенных мышей HLA-A2/DR1 подвергали ID-вакцинации с помощью INVAC-1 с последующей электропорацией в режиме прайм-буст или ложной вакцинации с PBS. Через 1 месяц после профилактической вакцинации мышей заражали подкожно 50000 клеток Sarc-2. Через каждые 2-3 дня измеряли объем опухолей. На фиг. 13А представлена кинетика среднего объема опухолей после заражения в зависимости от обработки мышей. Затем рассчитывали замедление роста опухолей (TGD) на уровне 500 мм³. Этот критерий позволяет измерять эффект обработки вакциной на рост опухолей путем сравнения времени до достижения заданного объема опухолей в контрольной и опытной группах. Наблюдалось 11-дневное замедление роста опухолей между группой мышей, вакцинированных INVAC-1, и группой животных, получавших PBS. Таким образом, профилактическая вакцинация с INVAC-1 была ответственна за замедление роста опухолей. Поскольку инокуляция опухолей проводилась через 1 месяц после последней вакцинации, то противоопухолевые эффекты в какой-то степени можно объяснить наличием hTERT-специфичных Т-клеток памяти.

Во второй серии экспериментов, трансгенным мышам прививали 20000 клеток Sarc-2 и подвергали их ID-вакцинации INVAC-1 с последующей электропорацией через 4 дня после инокуляции клеток (фиг. 13В). Контрольные животные получали ID инъекцию "пустой" плазмиды (NTC), которая имеет тот же каркас, что и INVAC-1, но не кодирует никаких опухолевых антигенов. Проводили 2 повторные (буст) вакцинации по такой же процедуре через 21 и 35 дней после прививания опухолей. Рассчитывали замедление роста опухолей на уровне 500 мм³. Наблюдалось 4-дневное замедление роста опухолей между группой мышей, вакцинированных INVAC-1, и группой животных, получавших пустую плазмиду NTC. В заключение, терапевтическая вакцинация с INVAC-1 вызывала сравнительно слабое, хотя и неоднократно отмечавшееся, замедление роста опухолей.

Введение мышиного GM-CSF вместе с ID-вакцинацией/электропорацией INVAC-1 повышает интенсивность и качество hTERT-специфичного клеточного иммунного ответа и замедляет рост опухолей после прививания сингенных опухолей у трансгенных мышей HLA-A2/DR1

До сих пор в качестве иммуномодуляторов, способствующих распознаванию антигенов и экспансии Т-клеток, в исследованиях по вакцинации против рака на моделях у животных и на людях использовались различные цитокины. Одним из наиболее часто используемых цитокинов является GM-CSF (гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор). Этот цитокин, как известно, способствует созреванию антигенпрезентирующих клеток и усиливает Th1-клеточные иммунные ответы (Parmiani et al., 2007). Учитывая важную роль, которую играет GM-CSF в контексте противоопухолевых вакцин, исследовали влияние добавления мышиного GM-CSF (mGM-CSF) на hTERT-специфичные Т-клеточные ответы после ID-вакцинации INVAC-1 и электропорации. С этой целью мышам C57BL/6 делали ID инъекцию mGM-CSF за 18 ч до вакцинации с INVAC-1 внутривенно с последующей электропорацией (фиг. 14А). Другую группу мышей подвергали ID-вакцинации с INVAC-1/электропорации без добавления mGM-CSF. Контрольных животных подвергали ложной вакцинации с PBS и электропорации. Через 14 дней после инъекции у мышей брали селезенки и измеряли индуцированные иммунные ответы методом ELISpot на IFN- γ , используя пептиды hTERT, рестрицированные H2. Наблюдалось значительное отличие по частоте Т-клеток CD8 IFN γ ⁺ между группой мышей, получавших mGM-CSF перед ID инъекцией INVAC-1, и группой, которая не получала ($p < 0,001$). Таким образом, добавление mGM-CSF вызвало сильное повышение частоты hTERT-специфичных Т-клеток CD8. Второй этап заключался в исследовании влияния этого иммуномодулятора на качество hTERT-специфичных Т-клеток CD4, в особенности на образование Th1-специфичных Т-клеток. Для этого спленоциты из вакцинированных INVAC-1 или INVAC-1/mGM-CSF трансгенных мышей HLA-A2/DR1 стимулировали *in vitro* в течение 24 ч пулом пептидов hTERT, приуроченных к DR1, или оставляли без стимуляции. Выделяли супернатанты и анализировали их на связывание цитокинов (CBA), чтобы определить концентрацию цитокинов Th1, Th2 и Th17, секретируемых hTERT-специфичными Т-клетками CD4. Как видно из фиг. 14В, отмечались значительные концентрации Th1-цитокинов IL-2, TNF α и IFN γ в супернатантах от спленоцитов, выделенных из мышей, вакцинированных INVAC-1/mGM-CSF, по сравнению с супернатантами от мышей, вакцинированных только лишь INVAC-1. При добавлении mGM-CSF отмечалось сильное повышение концентрации TNF α ($p < 0,01$), IFN γ ($p < 0,05$) и IL-2 ($p < 0,05$), которые являются противоопухолевыми цитокинами Th1.

После этого исследовали комбинацию mGM-CSF/INVAC-1 на модели опухолей Sarc-2 у животных с тем, чтобы установить, может ли mGM-CSF усиливать противоопухолевые эффекты.

С этой целью трансгенным мышам HLA-A2/DR1 прививали 20000 клеток Sarc-2 и подвергали их ID-вакцинации INVAC-1 с последующей электропорацией через 4 дня после прививания клеток (фиг. 14С). Контрольные животные получали ID инъекцию пустой плазмиды (NTC) и mGM-CSF либо

PBS и mGM-CSF. Проводили две повторные (буст) вакцинации по такой же процедуре через 21 и 35 дней после прививания опухолей. Рассчитывали замедление роста опухолей (TGD) на уровне 500 мм³. Наблюдалось 14-дневное TGD между группой мышей, вакцинированных INVAC-1/mGM-CSF, и группой животных, получавших NTC/mGM-CSF; наблюдалось 10-дневное TGD между группами INVAC-1/mGM-CSF и PBS/mGM-CSF. Эти результаты показывают, что терапевтическая вакцинация INVAC-1 в сочетании с mGM-CSF вызывает замедление роста опухолей.

Введение мышинного IL-12 вместе с ID-вакцинацией/электропорацией INVAC-1 повышает интенсивность hTERT-специфичного ответа Т-клеток CD8.

Также исследовали влияние цитокина IL-12 на hTERT-специфичный ответ Т-клеток CD8 после ID-вакцинации INVAC-1 и электропорации. С этой целью мыши HLA-A2/DR1 получали ID инъекцию IL-12 вместе с ID введением INVAC-1 и последующей электропорацией (фиг. 15). Другую группу мышей подвергали ID-вакцинации INVAC-1/электропорации без добавления IL-12. Контрольных животных подвергали ложной вакцинации PBS и IL-12 либо одним PBS с последующей электропорацией. Через 14 дней после инъекции у мышей брали селезенки и измеряли индуцированные иммунные реакции методом ELISpot на IFN- γ , используя пептиды hTERT, рестрицированные A2. Частота реагирующих мышей повышалась при добавлении IL-12. Так, 2 из 5 и 4 из 5 животных были восприимчивы в группе, вакцинированной INVAC-1, и в группе, вакцинированной INVAC-1/IL-12, соответственно.

Пример II.

Сокращения:

AA: аминокислота;

п.н.: пара нуклеотидов(оснований);

CTL: цитотоксический Т-лимфоцит;

CMV: цитомегаловирус;

ДНК: дезоксирибонуклеиновая кислота;

EP: электропорация;

ID: интрадермально;

NoLS: последовательность ядрышковой локализации;

РНК: рибонуклеиновая кислота;

RTA: относительная теломеразная активность;

TRAP: протокол амплификации теломерных повторов;

TERT: обратная транскриптаза теломеразы;

Ubi: убиквитин;

VDD: валин-аспарагиновая кислота - аспарагиновая кислота.

Материалы и методы.

Плазмидные ДНК-векторы.

INVAC-1.

Конструкция INVAC-1 уже описана в примере I.

Перетасованные производные INVAC-1.

Конструкции pUTScram и pUTInv представляют собой плазмиды из двухцепочечной ДНК примерно в 8,9 т.п.о., кодирующие слитые белки типа убиквитин-теломеразы человека, которые ферментативно неактивны. Трансгены Перетасованный (перетасованный) и Инвертированный (инвертированный) вставляли в вектор pcDNA3.1(+) от Invitrogen (5,4 т.п.о.), происходящий из pcDNA3.0, который был разработан для стабильной или краткосрочной экспрессии на высоком уровне в клетках млекопитающих. Экспрессия трансгена управляется самым ранним промотором цитомегаловируса человека (CMV), который обеспечивает эффективную экспрессию на высоком уровне в широком круге клеток млекопитающих. Вектор содержит множественные сайты клонирования (MCS) для облегчения клонирования. Эффективная терминация транскрипции управляется сигналом полиаденилирования бычьего гормона роста (BGH).

pUTScram (именуется перетасованный).

Вставка Ubi-перетасованный hTERT (Перетасованный, 1184 а.к.) начинается в положении 923 и заканчивается в положении 4474 плазмиды pUTScram (фиг. 20A). pUTScram кодирует слитую конструкцию типа убиквитин-теломеразы человека (перетасованная) из 1184 а.к., что соответствует белку примерно в 130,2 кДа. Из белка hTERT удалены первые 23 аминокислоты (а.к. 1-23), которые заменены полипептидом убиквитина (76 а.к.). Каталитический сайт инактивирован делецией 9 п.н., кодирующих VDD (отметка *; фиг. 28) и соответствующих а.к. 867-869 теломеразы дикого типа человека (hTERT, патент WO 2007/014740; и изоформа 1 hTERT, номер доступа NM_198253). Последовательность hTERT была разделена на 10 иммуногенных фрагментов и вновь собрана в следующем определенном порядке:

фрагмент 7 (210 п.н.),

фрагмент 2 (201 п.н.),

фрагмент 6 (312 п.н.),

фрагмент 4 (117 п.н.),

фрагмент 9 (576 п.н.),

фрагмент 3 (120 п.н.),

фрагмент 1 (258 п.н.),
фрагмент 8 (477 п.н.),
фрагмент 10 (516 п.н.),
фрагмент 5 (303 п.н.).

Эти 10 фрагментов соединяются линкером 6xGly (G-линкер; 18 п.н.). Следовательно, из последовательности hTERT удалены 76 неиммуногенных а.к. (228 п.н.). 14 аминокислот в С-концевой последовательности перетасованной вставки Ubi-hTERT кодируют эпитопный тег V5 (фиг. 22).

pUTInv (именуется инвертированный).

Вставка Ubi-инвертированный hTERT (Инвертированный, 1184 а.к.) начинается в положении 923 и заканчивается в положении 4474 плазмиды pUTInv (фиг. 20B). pUTInv кодирует слитую конструкцию типа убиквитин-теломераза человека (инвертированная) из 1184 а.к., что соответствует белку примерно в 130,2 кДа. Из белка hTERT удалены первые 23 аминокислоты (а.к. 1-23), которые заменены полипептидом убиквитина (76 а.к.). Каталитический сайт инактивирован делецией 9 п.н., кодирующих VDD (отметка *; фиг. 29) и соответствующих а.к. 867-869 теломеразы дикого типа человека (hTERT, патент WO 2007/014740; номер доступа NM_198253). Последовательность hTERT была разделена на 10 иммуногенных фрагментов и вновь собрана в следующем определенном порядке:

фрагмент 10 (516 п.н.),
фрагмент 9 (576 п.н.),
фрагмент 8 (477 п.н.),
фрагмент 7 (210 п.н.),
фрагмент 6 (312 п.н.),
фрагмент 5 (303 п.н.),
фрагмент 4 (117 п.н.),
фрагмент 3 (120 п.н.),
фрагмент 2 (201 п.н.),
фрагмент 1 (258 п.н.).

Эти 10 фрагментов соединяются линкером 6xGly (G-линкер; 18 п.н.). Следовательно, из последовательности hTERT удалены 76 неиммуногенных а.к. (228 п.н.). 14 аминокислот в С-концевой последовательности перетасованной вставки Ubi-hTERT кодируют эпитопный тег V5 (фиг. 22).

Синтез и клонирование генов.

Гены синтезировали de novo методом сборки из перекрывающихся олигонуклеотидов - 40-меров (GeneCust, Люксембург). Делали несколько консервативных замен оснований, чтобы устранить рестрикционные сайты и истощить богатые GC последовательности. Синтез генов включал уникальные фланговые рестрикционные сайты HindIII/XbaI для субклонирования гена в желательной системе экспрессии. Синтезированные гены клонировали между рестрикционными сайтами HindIII и XbaI экспрессирующего вектора pcDNA3.1(+) (Invitrogen, Carlsbad, США). Последовательности плазмид проверяли путем секвенирования с помощью праймеров PEGFP-N5' (CGGTGGGAGGTCTATATAAG; SEQ ID NO: 27) и BGH (CAGGGTCAAGGAAGGCAC; SEQ ID NO: 28).

Продукция плазмид.

Эти перетасованные производные INVAC-1, синтезированные на фирме GeneCust, подвергали трансформации и производили в клетках E.coli 5-α (fhuA2Δ(argF-lacZ)U169 phoA glnV44 Φ80 Δ(lacZ)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17) (Lucigen Corporation, Middleton, США, № 60602-2) на фирме RD Biotech (Besancon, Франция). Клетки высевали и культивировали в среде Lenox Broth, содержащей ампициллин (# EU04000D, Euromedex). После экстракции и очистки готовили концентрированные препараты лишенных эндотоксинов плазмид типа гигапреп (2 мг/мл) и ресуспендировали их в стерильном 1×PBS. Векторы проверяли методом рестрикционного картирования (HindIII-XbaI; фиг. 21).

pTRIP-CMV-hTERT.

Эта ДНК-плазида уже описана в примере I.

Культивирование клеток и краткосрочная трансфекция для анализа методами вестерн-блот и TRAP.

Клетки линии CrFK (из почек кошки Crandell Rees) и HEK293T (эмбриональных почек человека) культивировали в модифицированной Дульбекко среде Игла (DMEM) с добавлением 10% инактивированной нагреванием фетальной телячьей сыворотки (PAA, Velizy-Villacoublay, Франция) и 1% пенициллина/стрептомицина (Life Technologies, Saint-Aubin, Франция).

Клетки культивировали в виде монослоя в чашках на 75 см² при 37°C в увлажненной атмосфере, содержащей 5% CO₂. Клетки культивировали до конfluence 70-80% в день трансфекции. Для метода вестерн-блот высевали 5×10⁵ клеток в 6-луночные планшеты для тканевой культуры и инкубировали в течение 24 ч. Для метода TRAP высевали 7×10⁵ клеток в 6-луночные планшеты для тканевой культуры и инкубировали в течение 24 ч.

Конструкции INVAC-1, pUTScram и pUTInv вводили путем трансфекции в клетки мишени с помощью реагента для трансфекции - катионного полимера jetPrime согласно инструкциям изготовителя (Polyplus-transfection Inc., Франция). В качестве положительного контроля использовали клетки, транс-

фецированные плазмидой pTRIP-CMV-hTERT, а в качестве отрицательного контроля - нетрансфецированные клетки. Через 4 ч трансфекционные среды удаляли и заменяли на 2 мл культуральной среды DMEM. После соответствующего времени для трансфекции - 18-96 ч для метода вестерн-блот и 24 ч для метода TRAP, клетки собирали и подвергали анализу на экспрессию и активность теломеразы.

Вестерн-блот.

Анализ методом вестерн-блот проводили с использованием трансфецированных клеток HEK293T. Процедура вестерн-блота описана в примере I.

Метод TRAP.

Эта процедура уже описана в примере I.

Мыши.

В этих экспериментах использовали трансгенную линию мышей HLA-B*0702.

Трансгенные мыши HLA-B*0702 экспрессируют домены $\alpha 1$ - $\alpha 2$ молекулы HLA-B*0702 человека и домен $\alpha 3$ молекулы H2D мыши. Эти мыши не экспрессируют молекулы H2-D^b и H2-K^b (Rohrlich, Cardinaud et. al., 2003).

Мышей использовали в возрасте от 9 до 15 недель и получали из Pasteur Institute of Paris. Животных содержали в свободном от определенных патогенов виварии Института Пастера (виварий Lwoff n°22, соглашение № В 75 15-07). Перед интрадермальным (ID) или внутривенным (IV) введением мышей анестезировали раствором смеси 2% ксилазина (Rompun, Bayer Santé, Loos, Франция) и 8% кетамина (Imalgen 1000, Merial, Lyon, Франция) в 1×фосфатно-солевом буфере (1×PBS, Life Technologies, Saint-Aubin, Франция) внутривенно (IV) в соответствии с весом индивидуального животного и продолжительностью анестезии. Все работы с животными велись в строгом соответствии с принципами надлежащего обращения с животными и соответствовали местным нормам по экспериментам на животных (Директива 2010/63/UE).

Пептиды hTERT.

Пептиды hTERT, рестрицированные HLA-B0702, были описаны ранее в примере I. Лиофилизированные пептиды растворяли в стерильной воде при 2 мг/мл и хранили при -20°C перед использованием.

Иммунизация мышей и процедура электропорации *in vivo*.

Интрадермальная (ID) иммунизация проводилась в нижней части боков мышей с помощью инсулиновых шприцов и специальных игл (U-100, 29GX1/2" - 0,33×12 мм, Teguto, Бельгия) после бритья. Ни после бритья, ни во время и после процедур иммунизации не наблюдалось никаких эритем. Каждое животное получало первичную ID инъекцию плазмиды (INVAC-1, pUTScram или pUTInv) по 100 мкг ДНК либо 1×PBS. В соответствии с режимом вакцинации, мыши могли получать аналогичную вторую инъекцию ДНК либо 1×PBS.

Электропорация ДНК *in vivo* проводилась с помощью системы электропорации Cliniporator® 2 с программным обеспечением (IGEA, Италия), снабженной пластинчатыми электродами (P-30-8G, IGEA). Непосредственно после ID или SC вакцинации, по месту инъекции делали кожную складку, полностью покрытую проводящим гелем (Labo FH, синий контактный гель, NM Medical, Франция), и помещали её между пластинчатыми электродами. Подавали два импульса различного напряжения (HV-LV): HV: 1250 В/см, 1 Гц, 100 мкс; 1 импульс, перерыв 1000 мс; LV: 180 В/см, 1 Гц, 400 мс, 1 импульс.

Метод ELISpot.

Анализ методом ELISpot проводили в соответствии с методикой, описанной в примере I. В примере II использовали только пул из трех специфических пептидов hTERT, приуроченных к HLA-B*0702 (p277, p351 и p1 123).

Анализ на цитотоксичность *in vivo*.

Анализ методом лизиса *in vivo* проводили в соответствии с методикой, описанной в примере I. В примере II использовали только два специфических пептида hTERT, приуроченных к HLA-B*0702 (p351 и p1123) соответственно, в качестве иммунодоминантного и субдоминантного пептидов.

Статистический анализ и обработка данных.

Для обработки, анализа и графического представления данных использовали программу GraphPad Prism 5. Данные представлены в виде среднего \pm стандартное отклонение или в виде медианы. Статистический анализ данных ELISpot проводили с помощью непараметрического теста Манна-Уитни и/или анализа по Краскел-Уоллис с критерием Данна для множественных сравнений. Значимость устанавливали по значению $p < 0,05$.

Результаты.

Характеристика и анализ последовательности ДНК плазмиды INVAC-1.

Характеристики и анализ последовательности ДНК плазмиды INVAC-1 уже описаны в примере I.

Характеристика и анализ последовательностей перетасованных производных конструкций INVAC-1 (pUTScram и pUTInv)

Были синтезированы и клонированы гены двух перетасованных производных INVAC-1 (фиг. 20). Эти конструкции основаны на нуклеотидной последовательности INVAC-1, описанной в примере I, и аминокислотной последовательности hTERT дикого типа, описанной в международной патентной заявке

WO 2007/014740.

Проводили оптимизацию кодонов для высокого уровня экспрессии в клетках млекопитающих (фиг. 27). Перетасованные трансгены Ubi-hTERT Перетасованный и Инвертированный были успешно лигированы в экспрессирующий вектор pcDNA3.1 (+) от Invitrogen, как показало расщепление HindIII и XbaI и электрофорез (фиг. 21). Вставки и стыки секвенировали с помощью праймеров PEGFP-N5' и BGN, соответствующих последовательностям вектора, фланкирующим ДНК вставки. Результаты секвенирования подтвердили, что трансгены были клонированы правильно (фиг. 28 и 29).

Белки перетасованных производных INVAC-1 правильно экспрессируются *in vitro* и подвергаются деградации в протеасомном пути.

Проводили анализ вестерн-блот, чтобы получить информацию о глобальной экспрессии белков hTERT дикого типа, INVAC-1, pUTScram и pUTInv от 18 ч до 96 ч после краткосрочной трансфекции *in vitro* в клетки линии HEK293T. Полосы белка hTERT дикого типа соответствовали размеру немодифицированного hTERT в 124,5 кДа (фиг. 23A и 23C, слева). В примере I было показано, что белки INVAC-1 быстро деградируют по времени в отличие от белков hTERT дикого типа, которые экспрессируются на стабильном уровне. Все время обнаруживались специфические полосы перетасованных белков: Перетасованный и Инвертированный (фиг. 23A и 23C, справа). У обоих эти полосы наблюдались при меньшем размере (<110 кДа), чем было предсказано для целых белков (130,2 кДа). Эти формы белков Перетасованный и Инвертированный соответствуют продуктам деградации. Действительно, на вестерн-блотах не обнаруживались неразрушенные продукты экспрессии Перетасованный и Инвертированный. Эти конструкции давали от 1 до 3 специфических полос, соответственно, что свидетельствует о быстрой деградации этих белков сразу же после их выработки. Как и у INVAC-1, такой же профиль деградации по времени для продуктов деградации проявлялся и после нормализации по β -актину в качестве контроля на нанесение (анализ по ImageJ; фиг. 23B). Продукты деградации Инвертированный проявляют профиль, более близкий к белкам других производных INVAC-1 (фиг. 23C, 23D и 3C: pUTD10Not, pUTD10Cog и pUTD23Tyn, см. пример I).

Перетасованные производные INVAC-1 имеют преимущественно цитоплазматическое распределение и профиль исключения из ядрышек.

Как показано для INVAC-1 и производных INVAC-1 (pUTD10Not, pUTD10Cog и pUTD23Tyn, см. пример I), перетасованные белки Перетасованный и Инвертированный, кодируемые pUTScram и pUTInv, распределяются между ядром и цитоплазмой с профилем исключения из ядрышек (данные не приводятся).

Перетасованные производные INVAC-1 не обладают ферментативной активностью.

Для оценки теломеразной активности у перетасованных конструкций Ubi-hTERT в отрицательной по теломеразе линии клеток CrFK проводили анализ TRAP. Активность теломеразы выявлялась только в клетках CrFK, трансфицированных hTERT дикого типа с помощью плазмиды pTRIP-CMV-hTERT.

Как видно из фиг. 24A, необработанные данные по поглощению показывают, что уровень теломеразной активности у белков Перетасованный и Инвертированный сравним с её уровнем в необработанных клетках.

Данные по относительной теломеразной активности (RTA) (фиг. 24B), которые представляют полностью обработанные результаты с учетом специфичности анализа с использованием различных отрицательных контролей, включая инактивированные нагреванием образцы, показывают, что INVAC-1 и производные INVAC-1 полностью лишены какой бы то ни было теломеразной активности.

Перетасованные конструкции hTERT индуцируют hTERT-специфичные реакции Т-клеток CD8.

Конструкции pUTScram и pUTInv разрабатывались с тем, чтобы индуцировать презентацию антигена из нескольких эпитопов hTERT, что повышает объем функций INVAC-1. Проводили сравнение иммуногенности pUTScram, pUTInv и INVAC-1 у мышей HLA-B7, иммунизированных ID с помощью различных конструкций с последующей электропорацией кожи после двух циклов иммунизации (режим прайм-буст). Через 10 дней после второй вакцинации/электропорации животных забивали. У мышей брали селезенки и измеряли индуцированные ответы Т-клеток CD8 методом ELISpot на IFN- γ , используя пептиды hTERT, приуроченных к HLA-B7 MHC класса I (пул из трех пептидов: p277, p351 и p1123). У мышей, вакцинированных INVAC-1, pUTScram (Перетасованный) и pUTInv (Инвертированный), наблюдались значительные отличия по частоте hTERT-специфичных Т-клеток CD8 от контрольных животных (фиг. 25).

Эти результаты показывают, что искусственно перетасованные конструкции hTERT, т.е. pUTScram (перетасованный) и pUTInv (инвертированный), были способны индуцировать существенно высокие уровни hTERT-специфичных реакций Т-клеток CD8 после двух циклов иммунизации, как и INVAC-1. Действительно, как показано ранее для INVAC-1, преимущество режима вакцинации прайм-буст состоит в избирательной стимуляции ранее активированных специфических Т-клеток и расширенной презентации эпитопов для выработки вторичных hTERT-специфичных Т-клеток с участием новых специфичных TCRs.

Вакцинация с помощью искусственно перетасованных конструкций hTERT, pUTScram и pUTInv, индуцирует цитотоксические hTERT-специфичные Т-клетки CD8 *in vivo*.

Среди иммунных клеток, имеющих существенное значение в противоопухолевых иммунных реакциях, цитотоксические Т-лимфоциты (CTL) CD8 и Т-клетки Th1 CD4 были идентифицированы как наиболее сильные эффекторные клетки (Vesely, Kershaw et. al., 2011; Braumuller, Wieder et. al., 2013).

Исследовали цитотоксическую активность hTERT-специфичных Т-клеток CD8 *in vivo* после ID-вакцинации/электропорации с INVAC-1, pUTScram и pUTInv. Для того, чтобы измерить *in vivo* цитолитическую мощность ответа hTERT-специфичных Т-клеток CD8⁺, вызванного иммунизацией при помощи ДНК, проводили анализ на цитотоксичность *in vivo*, используя меченные сукцинимидоловым эфиром карбоксифлуоресцеин-диацетата (CFSE) и обработанные пептидами спленоциты в качестве клеток мишени. Трансгенным мышам HLA-B7, получившим одну вакцинацию с помощью ДНК-конструкций (или PBS в качестве контроля) интрадермально (ID), как описано выше, вводили внутривенно 7×10^6 клеток мишени. Клетками мишени служили спленоциты от наивных конгенных мышей, меченные независимо друг от друга при 3 различных концентрациях CFSE и либо обработанные пептидами hTERT, приуроченными к HLA-B7 (p351, иммунодоминантный пептид, или p1123, субдоминантный пептид), либо оставленные необработанными в качестве внутреннего контроля. Через 15-18 ч у иммунизированных мышей брали селезенки и подвергали анализу суспензии спленоцитов методом проточной цитометрии. Рассчитывали процент специфического лизиса оценивали путем сравнения соотношения обработанных и необработанных меченных CFSE клеток у вакцинированных мышей в сравнении с контрольными мышами.

Результаты показывают, что у всех мышей, иммунизированных различными конструкциями, вырабатывались hTERT-специфичные цитотоксические Т-лимфоциты (CTLs) после одной иммунизации.

Как и ожидалось, цитотоксичность против иммунодоминантного пептида p351 была выше, чем против субдоминантного пептида p1123 для всех трех групп (фиг. 26).

Иммунизация с помощью INVAC-1 и pUTInv приводила к специфическому лизису несущих иммунодоминантные эпитопы теломеразы (p351) клеток мишени на 37 и 35% соответственно (фиг. 26, черные точки). Для сравнения, иммунизация с помощью pUTScram приводила к специфическому лизису на 20%. У двух из пяти иммунизированных INVAC-1 мышей и одной из шести pUTScram вырабатывались специфические CTLs против субдоминантного пептида p1123 (фиг. 26, серые точки).

Как уже сказано выше, можно ожидать, что многократные циклы инъекций позволят увеличить количество животных, у которых возникают специфические CTLs с лизисом против и иммунодоминантных, и субдоминантных пептидов. Действительно, предыдущие результаты (см. пример I) показали, что вторая иммунизация увеличивает широту иммунного ответа против субдоминантных эпитопов.

В заключение, как и с INVAC-1, иммунизация с помощью искусственно перетасованного hTERT Перетасованный или Инвертированный может генерировать hTERT-специфичные Т-клетки CD8, проявляющие цитолитическую активность *in vivo*.

Библиография

- Adolph, K. 1996, ed. "Viral Genome Methods" CRC Press, Florida.
- Adotevi, O., Mollier, K., Neuveut, C., Cardinaud, S., Boulanger, E., Mignen, B., Fridman, W.H., Zanetti, M., Charneau, P., Tartour, E., et al. (2006). Immunogenic HLA-B*0702-restricted epitopes derived from human telomerase reverse transcriptase that elicit antitumor cytotoxic T-cell responses. *Clin Cancer Res* 12, 3158-3167.
- Andersson, H.A., and Barry, M.A. (2004). Maximizing antigen targeting to the proteasome for gene-based vaccines. *Mol Ther* 10, 432-446.
- Bachmair, A., Finley, D., and Varshavsky, A. (1986). In vivo half-life of a protein is a function of its amino-terminal residue. *Science* 234, 179-186.
- Braumuller, H., Wieder, T., Brenner, E., Assmann, S., Hahn, M., Alkhaled, M., Schilbach, K., Essmann, F., Kneilling, M., Griessinger, C., et al. (2013). T-helper-1-cell cytokines drive cancer into senescence. *Nature* 494, 361-365.
- Cadima-Couto, I., Freitas-Vieira, A., Nowarski, R., Britan-Rosich, E., Kotler, M., and Goncalves, J. (2009). Ubiquitin-fusion as a strategy to modulate protein half-life: A3G antiviral activity revisited. *Virology* 393, 286-294.
- Cheever et al., The prioritization of cancer antigens: a national cancer institute pilot project for the acceleration of translational research. *Clin Cancer Res*, 2009. 15(17): 5323-37.
- Combadiere, B., and Liard, C. (2011). Transcutaneous and intradermal vaccination. *Human Vaccines* 7, 811-827.
- Cortez-Gonzalez, X., Sidney, J., Adotevi, O., Sette, A., Millard, F., Lemonnier, F., Langlade-Demoyen, P., and Zanetti, M. (2006). Immunogenic HLA-B7-restricted peptides of hTERT. *Int Immunol* 18, 1707-1718.
- Dosset, M., Godet, Y., Vauchy, C., Beziaud, L., Lone, Y.C., Sedlik, C., Liard, C., Levionnois, E., Clerc, B., Sandoval, F., et al. (2012). Universal cancer peptide-based therapeutic vaccine breaks tolerance against telomerase and eradicates established tumor. *Clin Cancer Res* 18, 6284-6295.
- Firat, H., Cochet, M., Rohrllich, P.S., Garcia-Pons, F., Darche, S., Danos, O., Lemonnier, F.A., and Langlade-Demoyen, P. (2002). Comparative analysis of the CD8(+) T cell repertoires of H-2 class I wild-type/HLA-A2.1 and H-2 class I knockout/HLA-A2.1 transgenic mice. *Internat Immunol* 14, 925-934.
- Godet, Y., Fabre-Guillevin, E., Dosset, M., Lamuraglia, M., Levionnois, E., Ravel, P., Benhamouda, N., Cazes, A., Le Pimpec-Barthes, F., Gaugler, B., et al. (2012). Analysis of spontaneous tumor-specific CD4 T cell immunity in lung cancer using promiscuous HLA-DR telomerase-derived epitopes: potential synergistic effect with chemotherapy response. *Clin*

Cancer Res 18, 2943-2953.

Lavigueur, A., H. La Branche, et al. (1993). A splicing enhancer in the human fibronectin alternate ED1 exon interacts with SR proteins and stimulates U2 snRNP binding. *Genes Dev* 7: 2405-2417.

Michalek, M.T., Grant, E.P., Gramm, C., Goldberg, A.L., and Rock, K.L. (1993). A role for the ubiquitin-dependent proteolytic pathway in MHC class I-restricted antigen presentation. *Nature* 363, 552-554.

Mir L.M. 2008. Application of electroporation gene therapy: past, current, and future. *Methods Mol Biol* 423: 3-17.

Murray, 1991, ed. "Gene Transfer and Expression Protocols" Humana Press, Clifton, N.J.

Pajot, A., Michel, M.L., Fazilleau, N., Pancre, V., Auriault, C., Ojcius, D.M., Lemonnier, F.A., and Lone, Y.C. (2004). A mouse model of human adaptive immune functions: HLA-A2.1-/HLA-DR1- transgenic H-2 class I/class II-knockout mice. *Eur J Immunol* 34, 3060-3069.

Parmiani, G., Castelli, C., Pilla, L., Santinami, M., Colombo, M.P., and Rivoltini, L. (2007). Opposite immune functions of GM-CSF administered as vaccine adjuvant in cancer patients. *Ann Oncol* 18, 226-232.

Rohrlich, P.S., Cardinaud, S., Firat, H., Lamari, M., Briand, P., Escriou, N., and Lemonnier, F.A. (2003). HLA-B*0702 transgenic, H-2KbDb double-knockout mice: phenotypical and functional characterization in response to influenza virus. *Int Immunol* 15, 765-772.

Rosenberg SA, Yang JC, Restifo NP (2004). Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines. *Nat Med.* 10: 909-15.

Sardesai NY, Weiner DB. 2011. Electroporation delivery of DNA vaccines: prospects for success. *Curr Opin Immunol* 23: 421-429.

Tasaki, T., Sriram, S.M., Park, K.S., and Kwon, Y.T. (2012). The N-end rule pathway. *Annu Rev Biochem* 81, 261-289.

Varshavsky, A. (1996). The N-end rule: functions, mysteries, uses. *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 12142-12149.

Vesely, M.D., Kershaw, M.H., Schreiber, R.D., and Smyth, M.J. (2011). Natural innate and adaptive immunity to cancer. *Annu Rev Immunol* 29, 235-271.

Yang, 1992, "Gene transfer into mammalian somatic cells *in vivo*", *Crit. Rev. Biotech.* 12: 335-356.

Yang, Y., Chen, Y., Zhang, C., Huang, H., and Weissman, S.M. (2002). Nucleolar localization of hTERT protein is associated with telomerase function. *Exp Cell Res* 277, 201-209.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Конструкция нуклеиновой кислоты для индукции иммунного ответа у субъекта против клеток, которые сверхэкспрессируют теломеразу, содержащая:

i) последовательность, кодирующую белок обратной транскриптазы теломеразы человека (hTERT), который лишен каталитической активности теломеразы и сигнала ядрышковой локализации и который слит на N-конце с убиквитином или кальретикулином, повышающим адресацию белка hTERT на протеасомы; и

ii) регуляторную последовательность, которая обеспечивает экспрессию белка, причем белок hTERT лишен каталитической активности теломеразы посредством делеции аминокислот, которые соответствуют аминокислотам V867, D868, D869 hTERT дикого типа (SEQ ID NO: 2), и белок hTERT лишен сигнала ядрышковой локализации посредством делеции, по меньшей мере, аминокислот 1-23 по сравнению с белком hTERT дикого типа (SEQ ID NO: 2).

2. Конструкция нуклеиновой кислоты по п.1, отличающаяся тем, что в белке hTERT дополнительно удалены от 1 до 12 аминокислот перед и/или после аминокислот, которые соответствуют аминокислотам V867, D868, D869 hTERT дикого типа (SEQ ID NO: 2).

3. Конструкция нуклеиновой кислоты по любому из пп.1, 2, отличающаяся тем, что в белке hTERT удалены аминокислоты 1-47 по сравнению с белком hTERT дикого типа (SEQ ID NO: 2).

4. Конструкция нуклеиновой кислоты по любому из пп.1-3, которая представляет собой ДНК, предпочтительно ДНК-плазмиду.

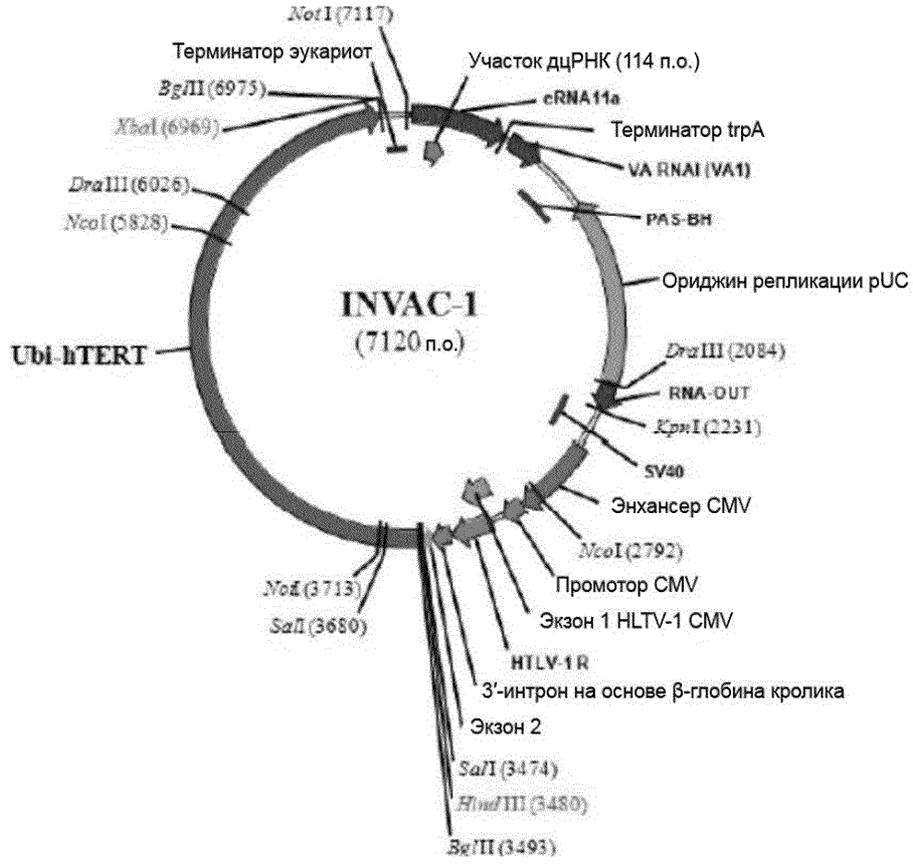
5. Конструкция нуклеиновой кислоты по п.4, которая кодирует аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12.

6. Конструкция нуклеиновой кислоты по п.5, которая содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 11 или нуклеотиды 3488-6961 из последовательности SEQ ID NO: 11.

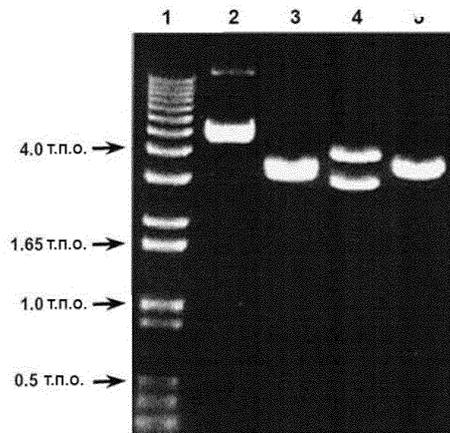
7. Конструкция нуклеиновой кислоты по п.4, которая кодирует аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14, 16 или 18 и предпочтительно содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 13, 15 или 17.

8. Применение конструкции нуклеиновой кислоты по любому из пп.1-7 для индукции иммунного ответа у субъекта против клеток, сверхэкспрессирующих теломеразу, таких как диспластические клетки, опухолевые клетки или клетки, инфицированные онковирусами.

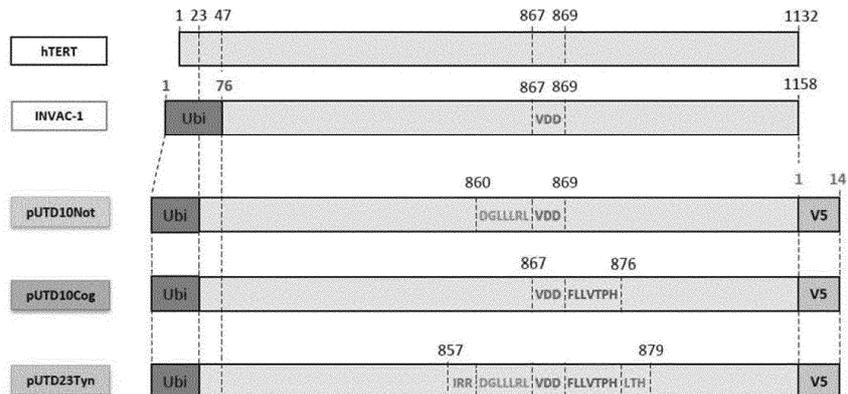
9. Применение конструкции нуклеиновой кислоты по любому из пп.1-7 для профилактики или лечения опухоли у субъекта.



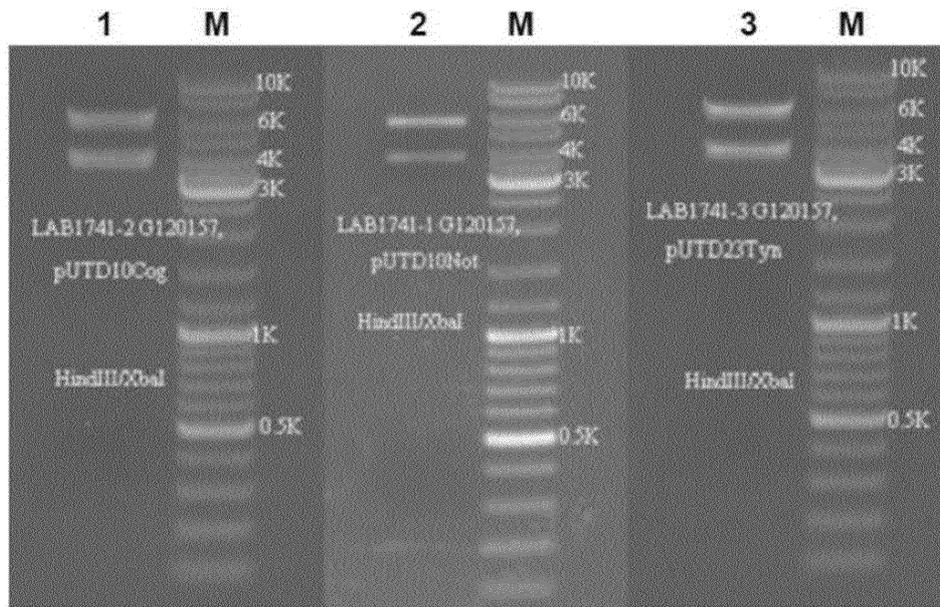
Фиг. 1А



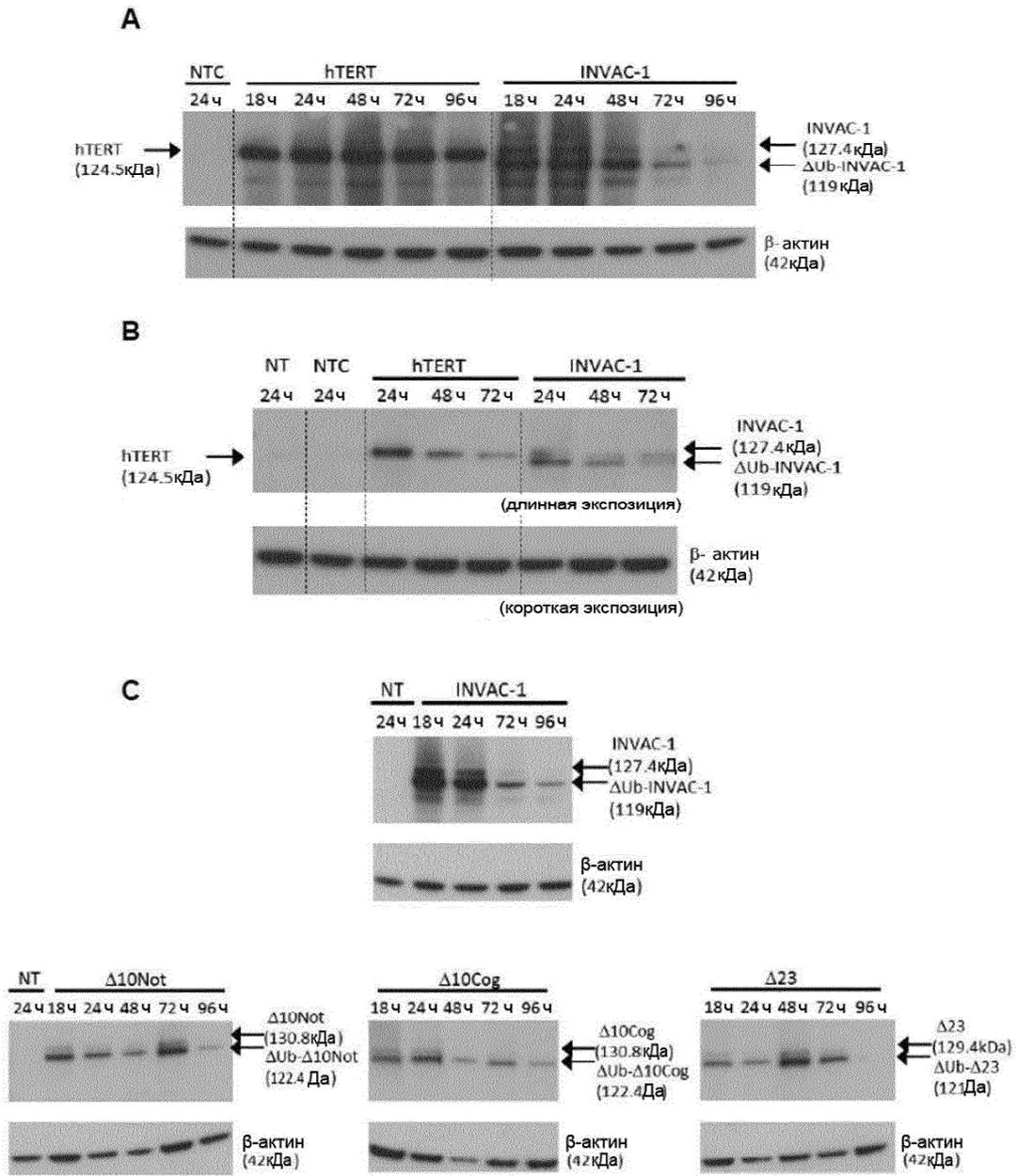
Фиг. 1В



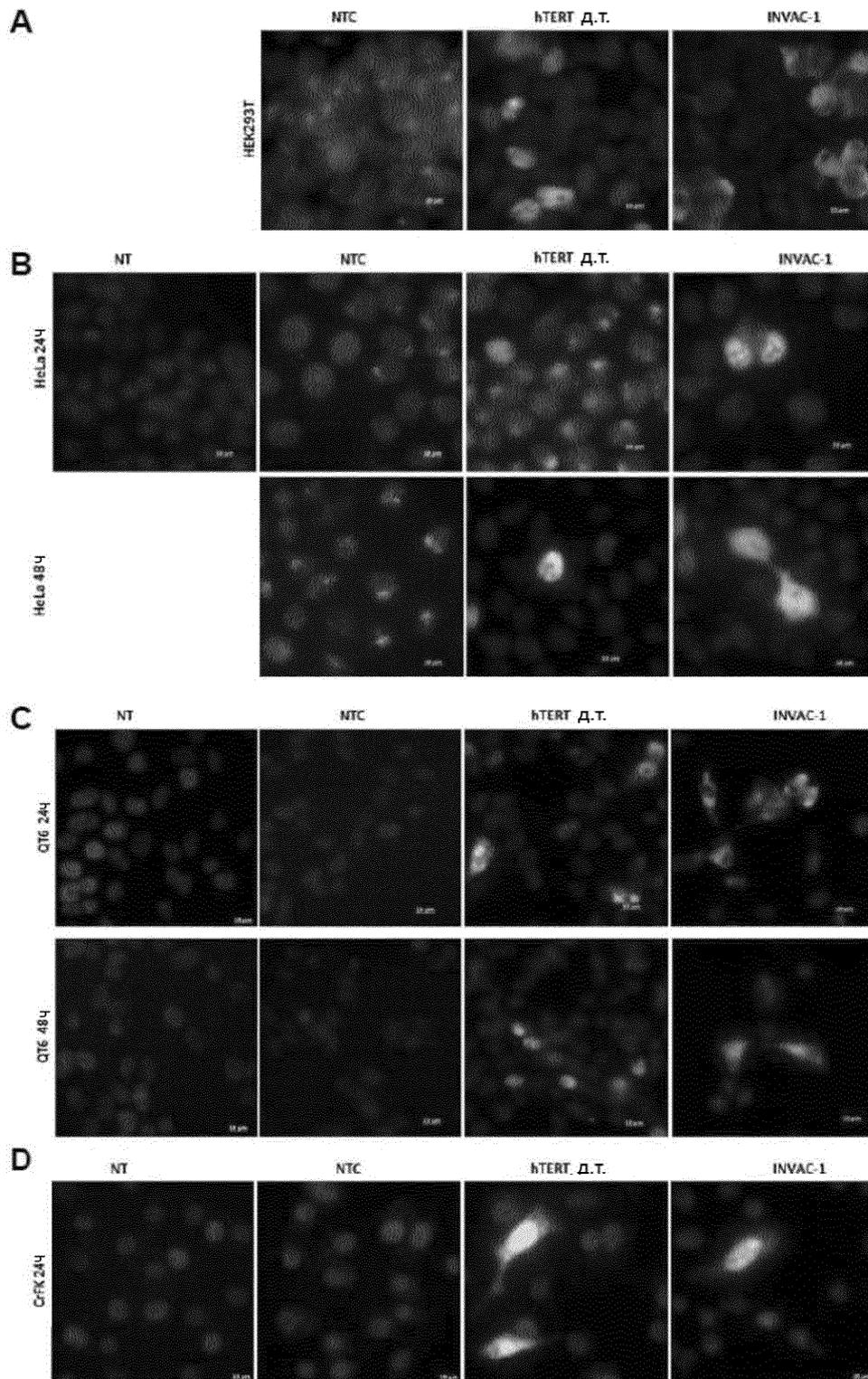
Фиг. 2А



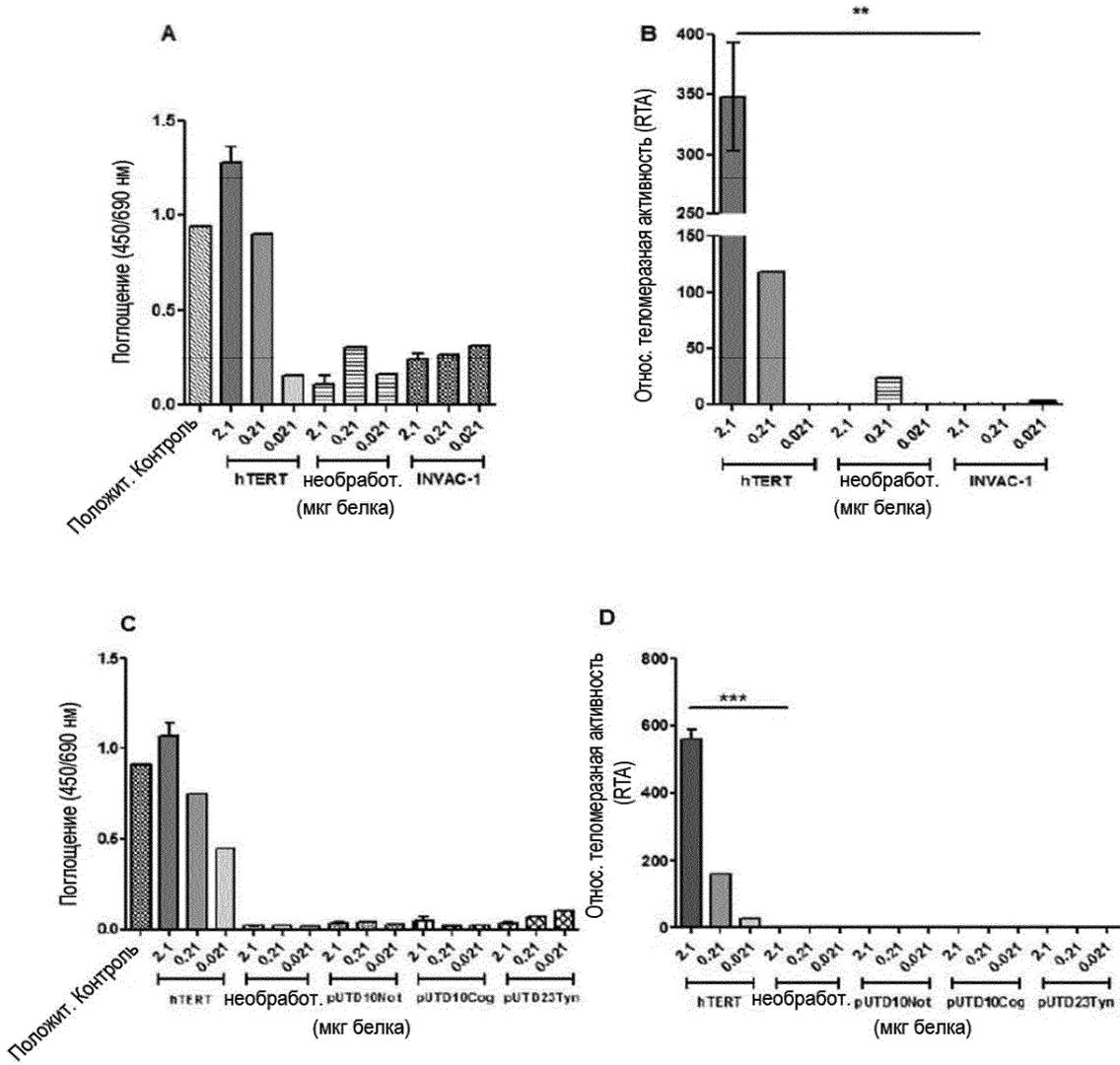
Фиг. 2В



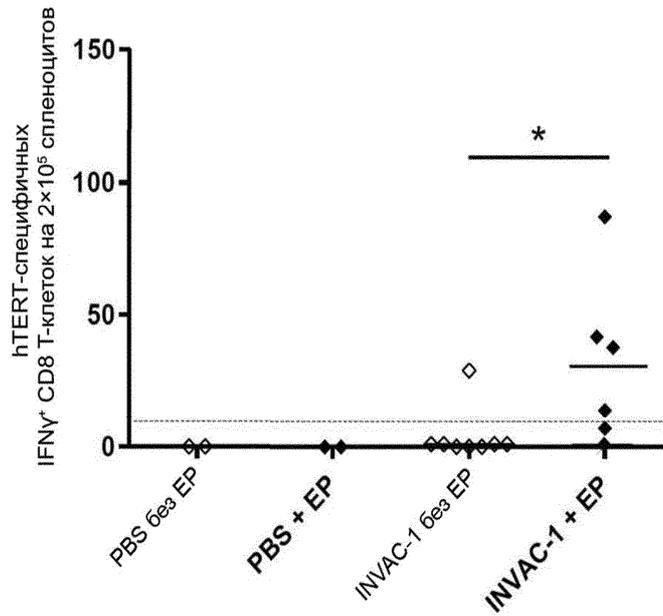
Фиг. 3



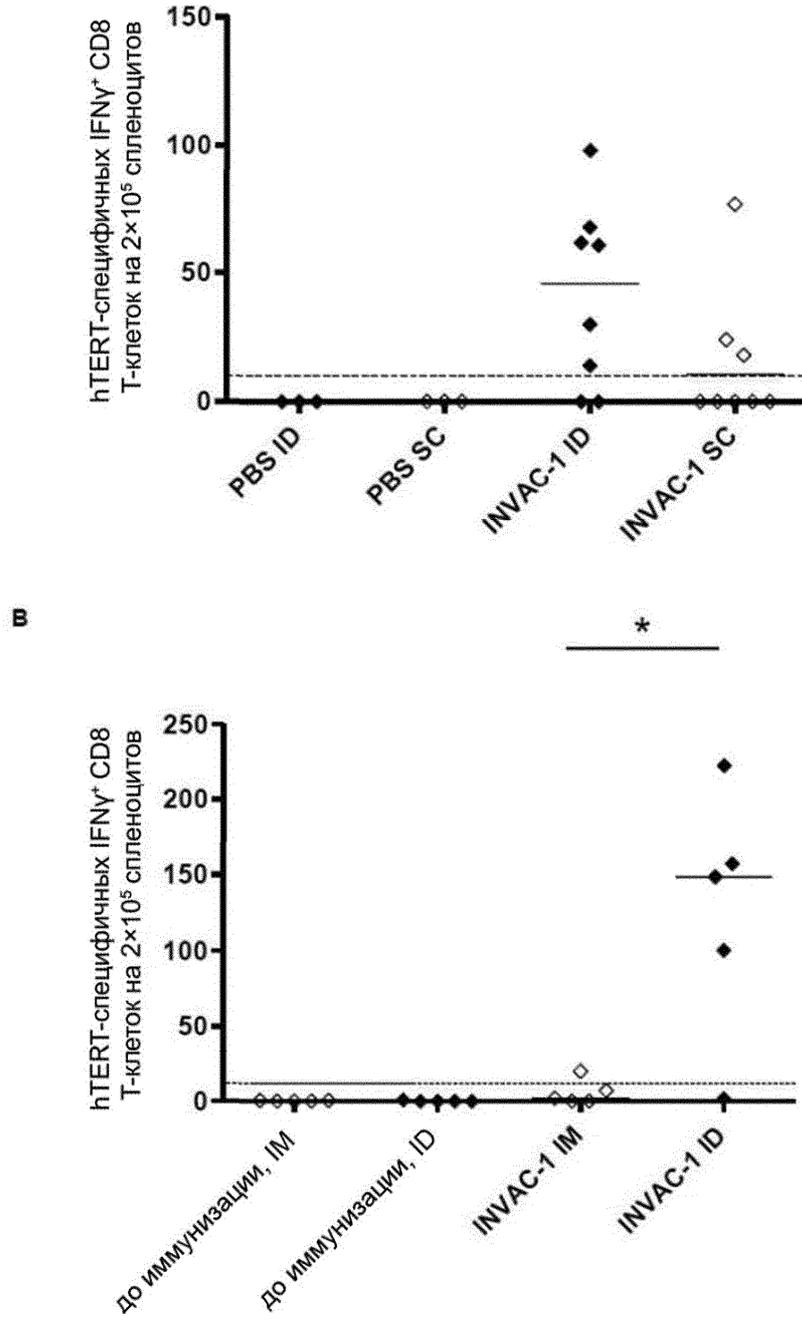
Фиг. 4



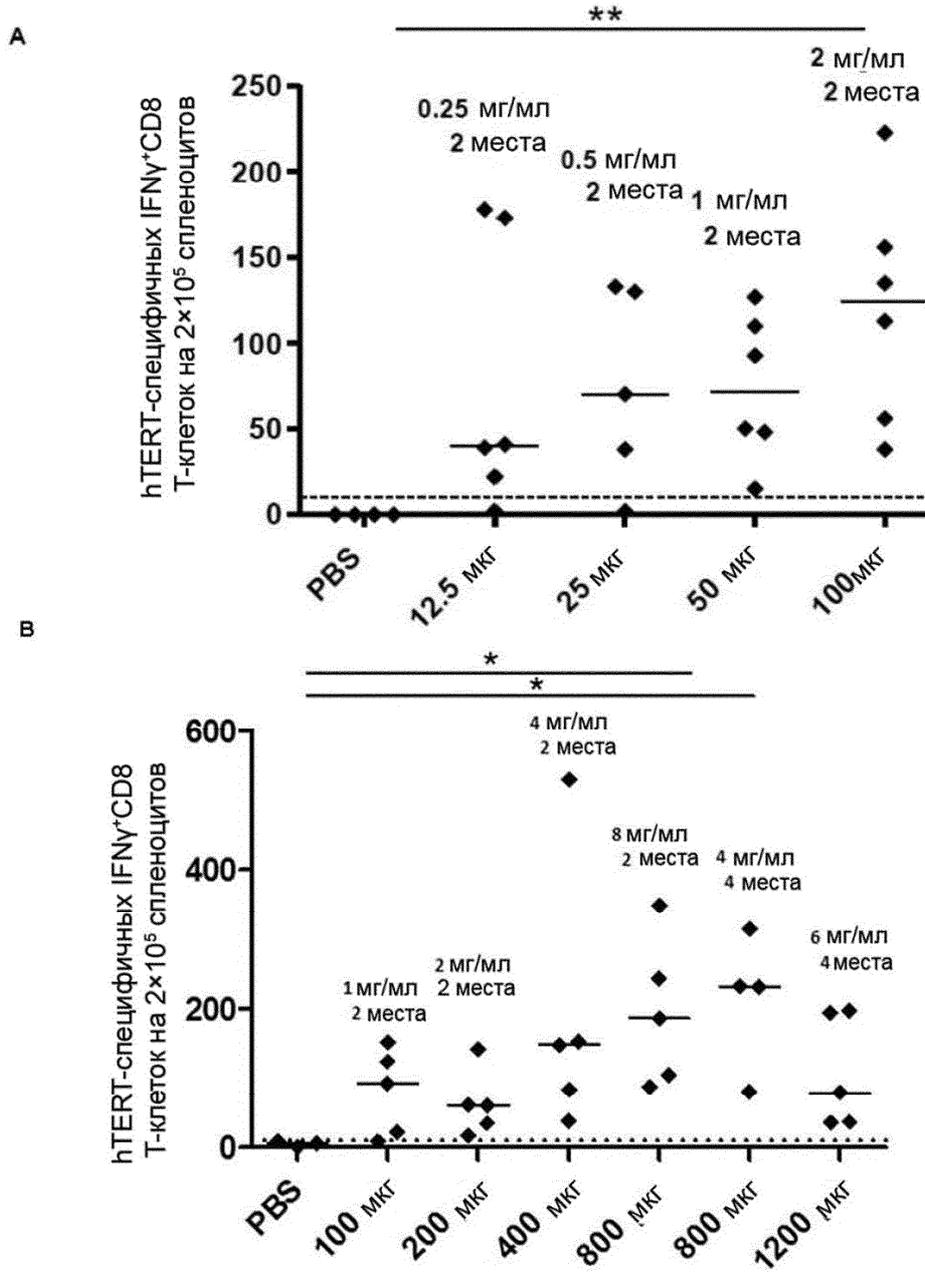
Фиг. 5



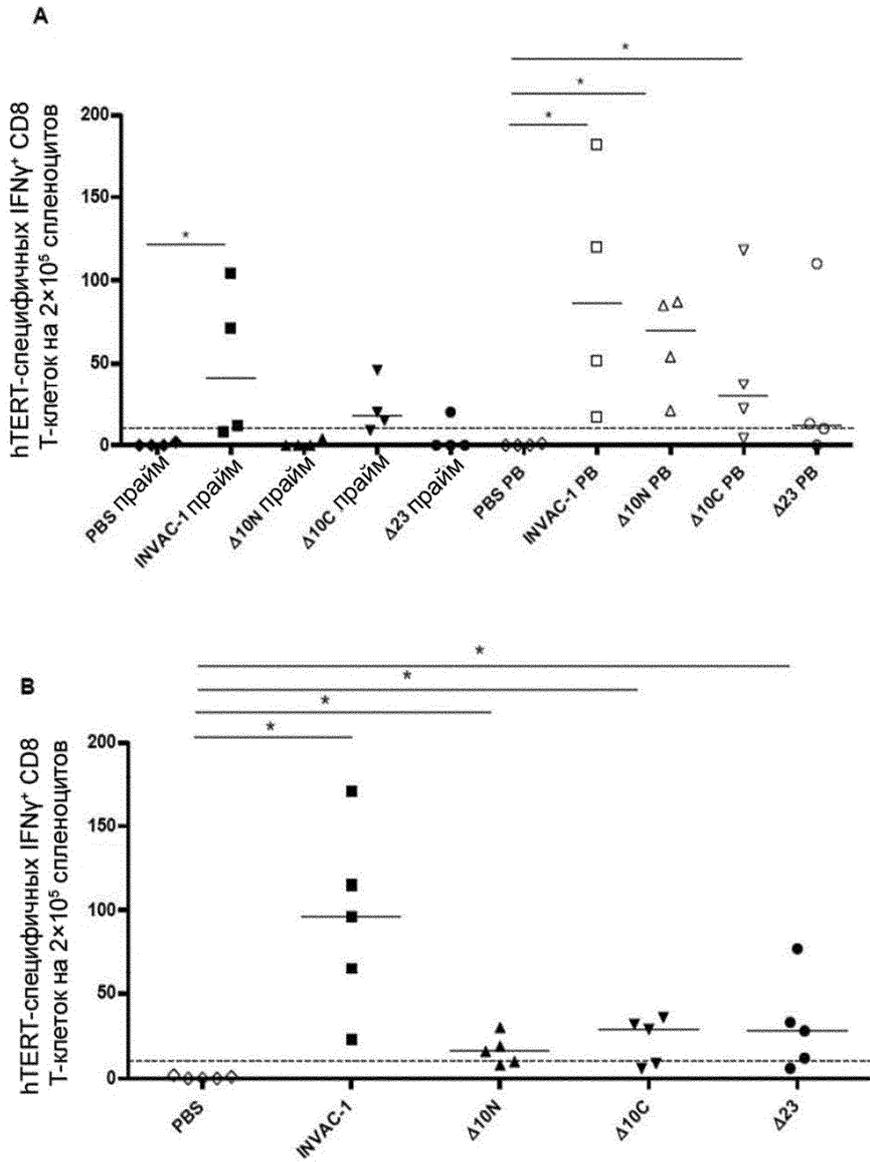
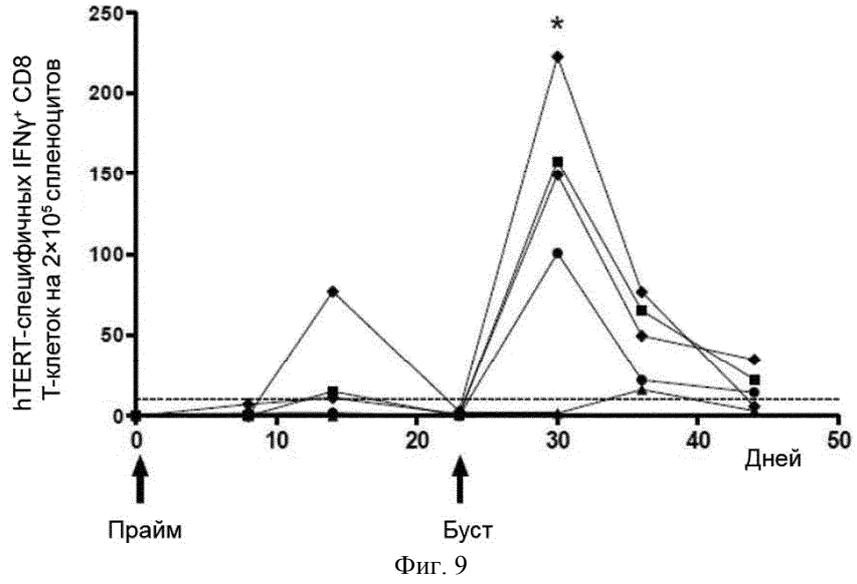
Фиг. 6

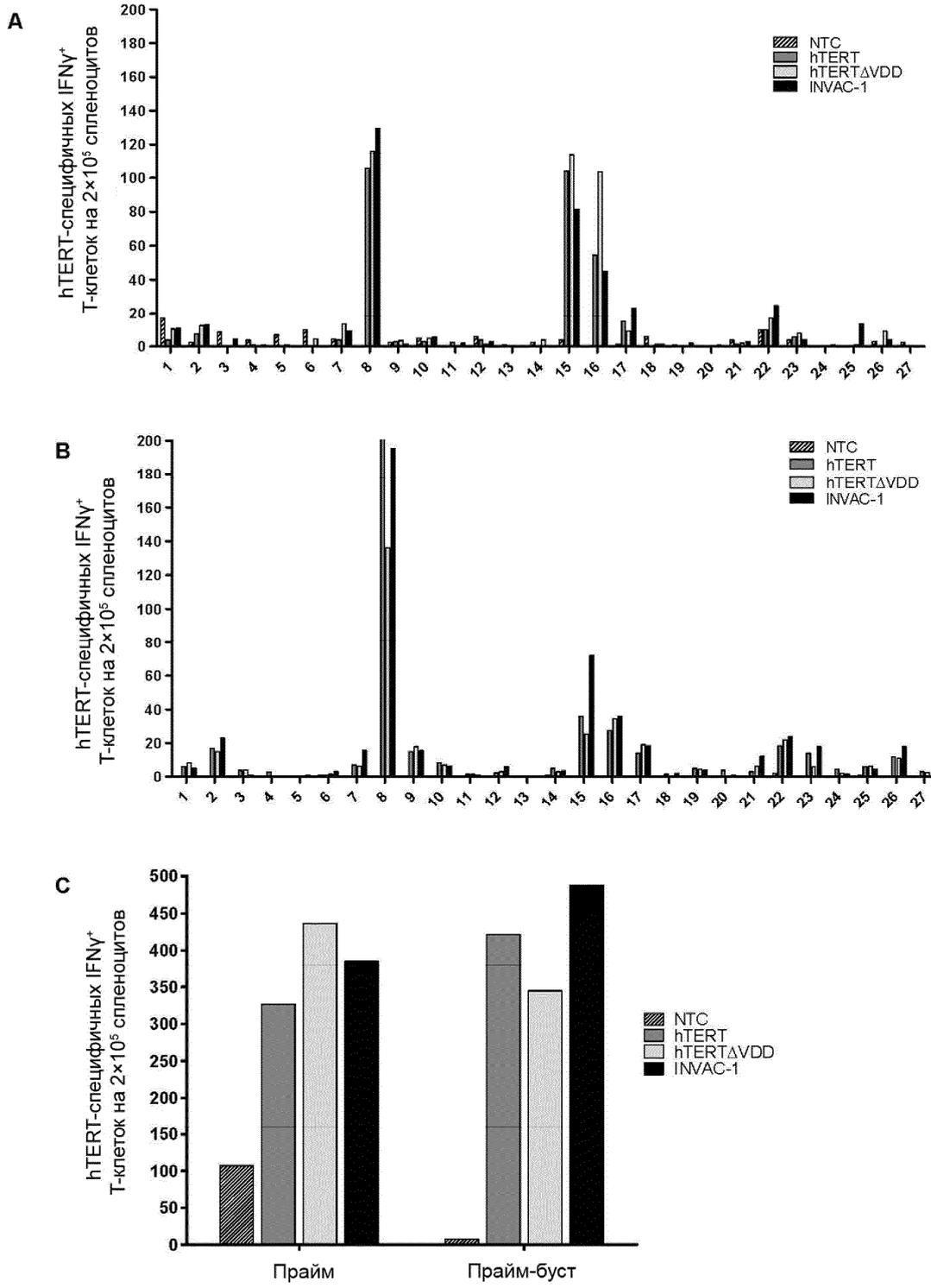


Фиг. 7



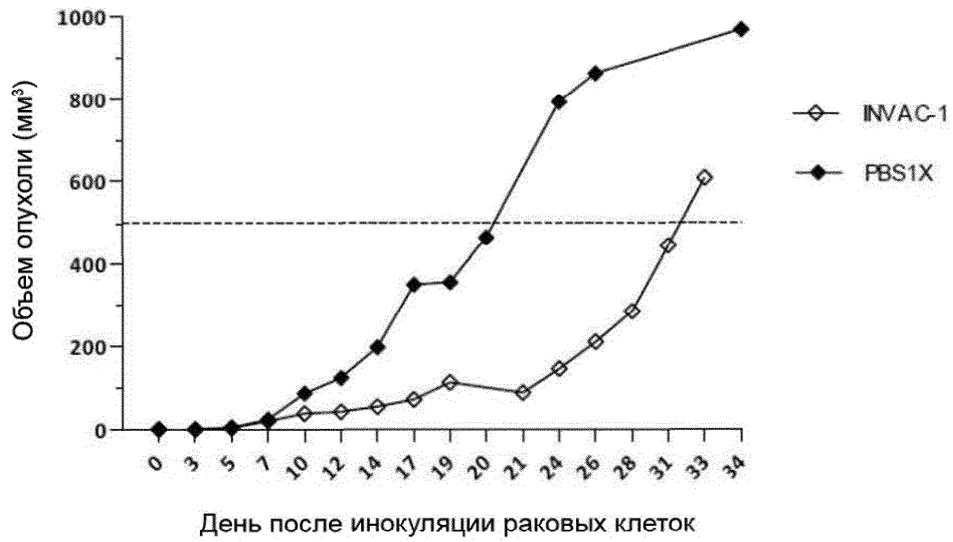
Фиг. 8



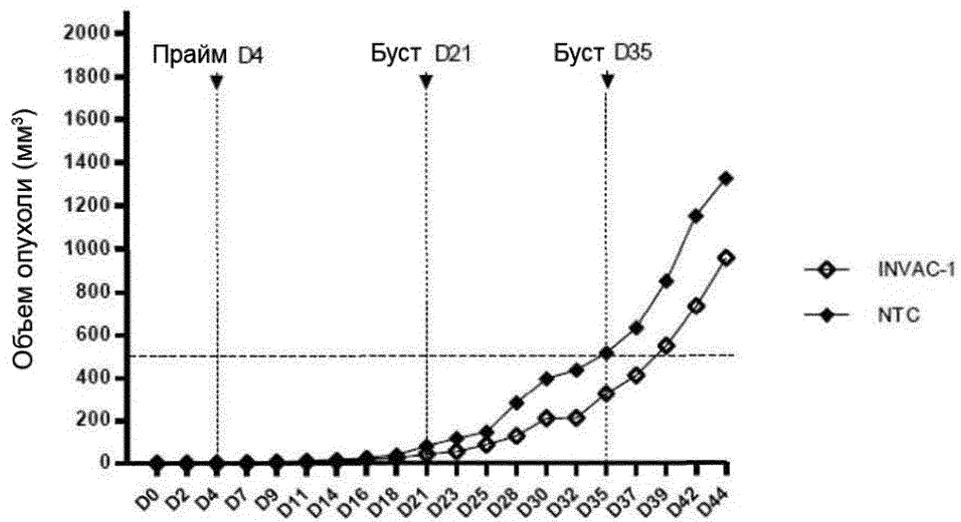


Фиг. 11

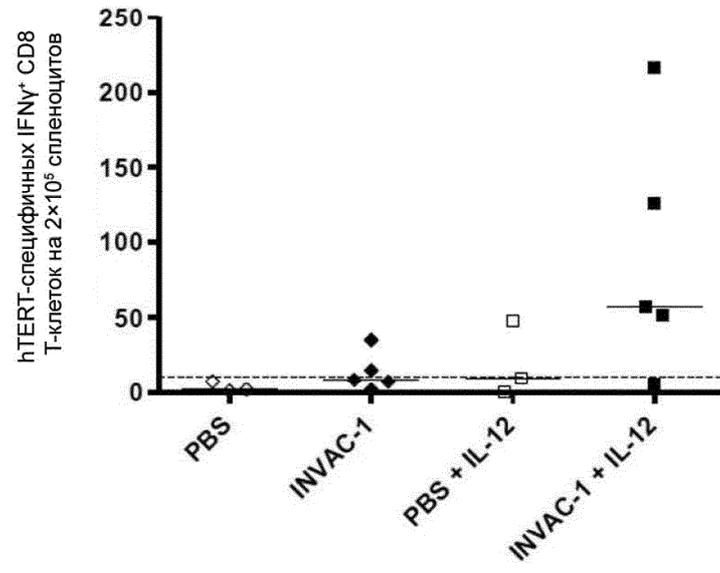
А



Б



Фиг. 13



Фиг. 15

NotI < eRNA11a агониста RIG-I
1 gctagcaccggttggtttccgtagtgtagtggttatcacgttcgcctaacacgcgaaaggt 60

< участок дцРНК

61 ccccggttcgaaaccgggcactacaaaaccaaacgtaaaaaacaggtcctccccatac 120

121 totttcattgtacacacccgaagctcgacaatcatcggattgaagcattgtcgcacacat 180

участок дцРНК >

181 ctccacacaggatcagtagcttccgttttaaccaaggcttttctccaagggatat 240

241 ttatagtctcaaaacacacaattactttacagttagggtagtcttcttttgctgtgtt 300

301 tttaaaataataattttagtatttgatctctttatagaaatccaagcctatcatgtaaaat 360

361 gttagctagtattaaaaagaacagattatctgtcttttatcgcacattaagcctctatagt 420

421 tactaggaatatttatatgcaaatcaaccggggcaggggagtagccgagcttctcccaca 480

eRNA11a агониста RIG-I > <trpA

481 agtctgtgcgagggggcggcgggcctagagatggcggcgtcggatcggccagcccg 540

терминатор прокариот trpA > < РНКI аденовируса 5 VA

541 ctaatgagcggcctttttttcttagggtgcaaaaggagagcctgtaagcgggcaectctt 600

601 ccgtggctcgtggataaattcgcaagggtatcatggcggacgaccggggttcgagcccc 660

661 gtatccggccgctccgctgcatccatcggttaccgcccggctgtcgaaccacaggtgtgc 720

VA RNAI > < PAS-BH

721 gacgtcagacaacgggggagtgctccttttggcttcttccctaccggctctgcctcgcg 780

Удлиненный ориджин репликации, содержащий сайт сборки примосом (PAS-BH)

781 cgtttcggtgatgacggtgaaaacctctgacacatgcagctcccggagacggtcacagct 840

841 tgtctgtaagcggatgcccgggagcagacaagcccgtcagggcgcgctcagcgggtgttggc 900

901 ggggtgtcggggcgcagccatgacccagtcacgtagcagatagcggagtgatactggctta 960

961 actatgoggcatcagagcagattgtactgagagtgcaccatagcgggtgtgaaataccgc 1020

PAS-BH >> ориджин репликации pUC

1021 acagatgcgtaaggagaaaaataaccgcatcaggcgtcttccgcttccctcgtcactgact 1080

1081 cgtcgcgctcggctcgttcggctgcggcgagcggatcagctcaactcaaaggcggtaataac 1140

1141 ggttatccacagaatcaggggataaacgcaggaaagaacatgtgagcaaaagggcagcaaa 1200

1201 aggccaggaaccgtaaaaaggccgcgcttgcctggcgtttttccataggctcccggccccctg 1260

1261 acgagcatcacaaaaatcgacgctcaagtcagaggtggcgaaccggacaggactataaa 1320

1321 gataccaggcgtttccccctggaagctccctcgtgcgctctcctgttccgaccctgccgc 1380

1381 ttaccggatacctgtccgcctttctcccttcgggaagcgtggcgctttctcatagctcac 1440

1441 gctgtaggtatctcagttcgggtgtaggtcgttcgctccaagctgggctgtgtgcacgaac 1500

1501 cccccgttcagcccagccgctgcgccttatccggtaactatcgtcttgagttccaaccgg 1560

1561 taagacacgacttatcgccactggcagcagccactggtaacaggattagcagagcgaggt 1620

1621 atgtagcgggtgctacagagttcttgaagtggggcctaactacggctacactagaagaa 1680

1681 cagtatttggatctcgcgctctgctgaagccagttaccttcggaaaaagagttggtagct 1740

1741 cttgatccggcaaacaaaccaccgctggtagcgggtgggttttttggttgcaagcagcaga 1800

1801 ttacgcccagaaaaaaaggatctcaagaagatcctttgatctttctacggggctctgacg 1860

1861 ctcagtggaacgaaaactcacgttaagggattttggatcatgagattatcaaaaaggatct 1920
1921 tcacctagatcccttttaaatataaaatgaagttttaaatcaatctaaagtatatatgagt 1980
1981 aaacttggctctgacagttaccaatgcttaatcagtgaggcacctatctcagcgatctgtc 2040
ориджин репликации pUC > DraIII < RNA-OUT
2041 tatttcgttcatccatagttgcctgactcctgcaaac**caacttgggt**agaattggtaaa 2100
2101 gagagtcgtgtaaaatategagttcgcacatcttgggtctgattattgatttttggcga 2160
2161 aaccatttggatcatatgacaagatgtgtatctaccttaacttaatgatttttgataaaaat 2220
RNA-OUT << Блок энхансера SV40
2221 cattag**gtaaccctgatac**actgtggaatgtgtgcagttagggtgtggaagtcaccagg 2280
KpnI BclI
2281 ctcccagcaggcagaagtatgcaaagcatgcactctcaattagtcagcaaccaggtgtgg 2340
2341 aaagtcaccaggctcccagcaggcagaagtatgcaaagcatgcactctcaattagtcagc 2400
Блок энхансера SV40 ><
2401 aaccatagtcccgcccctaaactccgcccacccgcccctaaactccgcccag**ttacgggg** 2460
Блок промотора, содержащий энхансер CMV-IE человека
2461 cattagttcatagcccatataggagttccgggttacataaacttaaggtaaatggcccgc 2520
2521 ctggctgaccgcccaacgacccccgcccattgacgtcaataatgacgtatgttcccatag 2580
2581 taacgccaatagggactttccattgacgtcaatgggtggagtatttacggtaaactgcc 2640
2641 acttggcagtcacatcaagtgtatcatatgccaaagtaacgcccctattgacgtcaatgacg 2700
2701 gtaaatggcccgcctggcattatgccagtcacatgacattatgggactttcctacttggc 2760
NcoI
2761 agtacatctacgtattagtcacgtcatt**caatggg**gatgcgggttttggcagtcacatca 2820
2821 atggcggtggatagcgggttgaactcacggggattttccaagtcctccaccccattgacgtca 2880
>< Промотор CMV
2881 atgggagtttgtttt**gg**accsaaaatcaaccgggactttccaaaatgtcgttaacaactccg 2940
2941 ccccattgacgcaaatgggggtaggcgtgtacgggtgggaggtctatataagcagagctc 3000
>< Нетранспируемый лидер (экзон 1)
3001 gtttagtgaaccgtcagatcgccctggagacgccatccacgctgttttgacctccatagaa 3060
< LTR области R HTLV-1
3061 gacacccgggacccgategacgctccgccc**ctcgc**atctctecttcacgcccgcgccct 3120
3121 acctgaggccgccatccacgcccgttgagtcgcggttctgcccctcccgcctgtgggtgcc 3180
Нетранспируемый лидер >
3181 tcctgaactgcgtccgcccgtctag**g**taagtttaagctcaggtcagacccggccctttgt 3240
3241 ccgcccctcccttggagcctacctagaactcagccggctctccacgctttgcccgtgacctg 3300
HTLV-1 R > < 3'-Инtron на основе β-глобина кролика
3301 cttgctcaactctagttctctcgttaacttaatgagacagatagaaactggctctttaga 3360
3361 aacagagtagtcgctgtttttctgccaggtgtgactctctcccctgggctttttct 3420
>< Экзон 2 (сайты связывания белка SR) SalI>
3421 tttctcaggttgaaaagaagaagacgaagaagacgaagaagacaaaccgt**ctcgacaa** 3480
HindIII BglII
3481 **gcttaccatgcagatct**tcgtgaagaccctgaccggcaagaccatcactctcgaggtgga 3540
M Q I F V K T L T G K T I T L E V E

< Убиквитин человека

3541 gccacagtacaccatcgaaaatgtgaaggccaagatccaagataaagaaggcatcccacc 3600
P S D T I E N V K A K I Q D K E G I P P

3601 cgaccagcagaggctcatcttttgetggcaagcagetggaagatggcgcgcaetctgtctga 3660
D Q Q R L I F A G K Q L E D G R T L S D

3661 ctacaacatccagaagaag**gtcgac**ccctgcacctggctcctgcgtctgagaggc**ggc**cgggc 3720
Y N I Q K E S T L H L V L R L R G G R A
Убиквитин человека << hTERT

3721 tetgggtggcccagtgccctgggtgtgcgtgcccctgggacgcacggccaccctgccgcacc 3780
L V A Q C L V C V P W D A R P P P A A P
Кодирующая последовательность обратной транскриптазы теломеразы человека (hTERT)

3781 ctcattccgccaaagtgtcctgcctgaaggagctgggtggcccagtgctgcagaggctgtg 3840
S F R Q V S C L K E L V A R V L Q R L C

3841 cgagcggcggcgcgaagaacgtgctggccttcggcttcggcgtgctggacggggctcggcg 3900
E R G A K N V L A F G F A L L D G A R G

3901 aggccaccgccgaggccttcaccaccagcgtgcgcagctacctgcccaacacggtgaccga 3960
G P P E A F T T S V R S Y L P N T V T D

3961 cgcactgcgggggagcggggcgtgggggtgctgttgccgcgcgtggggcagcagctgct 4020
A L R G S G A W G L L L R R V G D D V L

4021 ggttcacctgctggcagctgcgcgctcttttgtgctgggtggctcccagctgcgcctacca 4080
V H L L A R C A L F V L V A P S C A Y Q

4081 ggtgtgcgggcccgcgctgtaccagctcggcgtgccactcaggcacggcctccacctca 4140
V C G P P L Y Q L G A A T Q A R P P P H

4141 cgctagtggaccccgaaaggcgtctgggatgcgaacgggcctggaaccatagcgtcagggg 4200
A S G P R R R L G C E R A W N H S V R E

4201 ggcgggggtccccctgggcctgccagccccgggtgcgaggaggcgcgggggcagtgccag 4260
A G V P L G L P A P G A R R R G G S A S

4261 ccgaagtctgccgttgcccaagagggcccagcgtggcgctgccctgagccggagcggac 4320
R S L P L P K R P R R G A A P E P E R T

4321 gccggttgggcaggggtcctgggcccaccgggcaggacgcgtggaccgagtaccctgg 4380
P V G Q G S W A H P G R T R G P S D R G

4381 tttctgtgtggtgtcacctgccagaccgccgaagaagccacctctttggagggtgcgct 4440
F C V V S P A R P A E E A T S L E G A L

4441 ctctggcagcgcgcaactccccaccatccgtgggcccgcagcaccacgcgggccccccatc 4500
S G T R H S H P S V G R Q H H A G P P S

4501 cacatcgcggccaccacgtccctgggacacgccttgtccccgggtgtacgcccagaccaa 4560
T S R P P R P W D T P C P P V Y A E T K

4561 gcacttcctctactcctcaggcgcacaaggagcagctgcggccatcctcctgctgagctc 4620
H F L Y S S G D K E Q L R P S F L L S S

4621 tetgaggeccagcctgactggcgtcgggagctcgtggagaccatctttctgggttccag 4680
L R P S L T G A R R L V E T I F L G S R

4681 gccttgatgccagggactccccgcaggttgccccgcctgccccagcgtactggcaaat 4740
P W M P G T P R R L P R L P Q R Y W Q M

4741 gcggccctgtttctggagctgcttgggaaccacgcgcagtgcccctacgggggtgctcct 4800
R P L F L E L L G N H A Q C P Y G V L L

4801 caagaagcaactgcccgcctgagagctgaggtcaccacagcagccggtgtctgtgcccggga 4860
 K T H C P L R A A V T P A A G V C A R E
 4861 gaagccccagggctctgtggggccccagaggaggacacagacccccgtgctgtgt 4920
 K P Q G S V A A P E E E D T D P R R L V
 4921 gcagctgctccgccagcacagcagcccccggcaggtgtacggcttcgtgcccggcctgct 4980
 Q L L R Q H S S P W Q V Y G F V R A C L
 4981 ggcggggctggtgccccagggcctctggggctccaggcacaacgaacgocgcttccctcag 5040
 R R L V P P G L W G S R H N E R R F L R
 5041 gaacaccaagaagtccatctccctgggggaagcatgccaaagctctcgtgagcaggagctgac 5100
 N T K K F I S L G K H A K L S L Q E L T
 5101 gtggaagatgagcgtgcccgggtgctgctggctgcccagggagcccaggggttgctgtgt 5160
 W K M S V R G C A W L R R S P G V G C V
 5161 tccggccgcagagcacccgtctgctgaggagatccctggccaagttccctgactggctgat 5220
 P A A E H R L R E E I L A K F L H W L M
 5221 gagtgtgtacgtcgtcagctgctcaggtcattcttttacgtgacggagaccacgtttca 5280
 S V Y V V E L L R S F F Y V T E T T E Q
 5281 aaagaacagggctgtttttctaccggaagagtgctctggagcaagttgcaaacgattggaat 5340
 K N R L F F Y R K S V W S K L Q S I G I
 5341 cagacagcacttgaagaggggtgcagctgcccggagctgtcgggaagcagaggtcaggcagca 5400
 R Q H L K R V Q L R E L S E A E V R Q H
 5401 tccgggaagccagggcccgcctgctgacgtccagaactccgcttccatcccccaagcctgacgg 5460
 R E A R P A L L T S R L R E I P K P D G
 5461 gctgcccgcgattgtgaacatggactacgtcgtgggagccagaaagttccgcagagaaaa 5520
 L R P I V N M D Y V V G A R T F R R E K
 5521 gagggccgagcgtctcaccctcaggggtgaaggcaactgttcagcgtgctcaactacgagcg 5580
 R A E R L T S R V K A L F S V L N Y E R
 5581 ggctcgggcgccctggcctcctggggcgcctctgtgctgggcctggacgatatccacagggc 5640
 A R R P G L L G A S V L G L D D I H R A
 5641 ctggccacacttctgtgctgctgctgcccggccaggaaccgcgcgctgagctgtaactttgt 5700
 W R T F V L R V R A Q D P P P E L Y F V
 5701 caagtggtatgtgacggggcgtacgacaccatccccagggacaggtcaccggaggtcat 5760
 K V D V T G A Y D T I P Q D R L T E V I
 5761 cgccagcatcatcaaacccagaaacagctactgcgtgctgctggatgcccgtggtccagaa 5820
 A S I I K P Q N T Y C V R R Y A V V Q K
 NcoI
 5821 ggccgc**cccatggg**cacgtccgcaagggccttcaagagccacgtctctaccttgacagacct 5880
 A A H G H V R K A F K S H V S T L T D L
 5881 ccagccgtacatgagacagttcgtggctcacctgcaggagaccagcccgtgagggatgc 5940
 Q P Y M R Q F V A H L Q E T S P L R D A
 5941 cgtcgtcatcgagcagagctcctccctgaatgaggccagcagtgccctcttcgacgtctt 6000
 V V I E Q S S S L N E A S S G L F D V F
 DraIII
 6001 cctacgcttccatgtgccac**ccagcgg**tgccatcaggggcaagtcctacgtccagtgcca 6060
 L R F M C H H A V R I R G K S Y V Q C Q
 6061 ggg**g**atccccgcagggctccatcctctccacgctgctctgcagcctgtgctacggcgacat 6120
 G I P Q G S I L S T L L C S L C Y G D M

6121 ggagaacaagctggttgcggggattcggcgggacgggctgctcctgcggttggtcttgtt 6180
 E N K L F A G I R R D G L L L R L F L L
 *

6181 ggtgacacctcactcaccacgcgaaaaccttctcaggaccctgggcccagggtgtccc 6240
 V T P H L T H A K T F L R T L V R G V P

6241 tgagtatggctgcgtggtgaacttgccgaagacagtgggtgaacttccctgtagaagacga 6300
 E Y G C V V N L R K T V V N F P V E D E

6301 ggccctgggtggcaccggttttgggtcagatgcccggcccacggcctattcccctgggtcgg 6360
 A L G G T A F V Q M P A H G L F P W C G

6361 cctgctgctggatacccggaccctggaggtgcagagcgactactccagctatgcccgga 6420
 L L L D T R T L E V Q S D Y S S Y A R T

6421 ctccatcagagccagctctcaccttcaaccggcgttcaaggctgggaggaacatgcgtcg 6480
 S I R A S L T F N R G F K A G R N M R R

6481 caaacctcttgggtcttggcgtgaagtgtcacagcctgtttctggatttgcaggtgaa 6540
 K L F G V L R L K C H S L F L D L Q V N

6541 cagcctccagacgggtgtgcaccaacatctacaagatcctcctgctgcaggcgtacaggtt 6600
 S L Q T V C T N I Y K I L L L Q A Y R F

6601 tcacgcgatgtgtgctgcagctcccatttcatcagcaagtttgaagaaccccacattttt 6660
 H A C V L Q L P F H Q Q V W K N P T F F

6661 cctgcgcgtcatctctgacacggcctccctctgctactccatcctgaaagccaagaacgc 6720
 L R V I S D T A S L C Y S I L K A K N A

6721 agggatgtcgtgggggccaagggcgccgcccctctgcccctccgaggccggtgcagtg 6780
 G M S L G A K G A A G P L P S E A V Q W

6781 gctgtgccaccaagcattcctgctcaagctgactcgacaccgtgtcacctacgtgccact 6840
 L C H Q A F L L K L T R H R V T Y V P L

6841 cctggggtcactcaggacagcccagacgcagctgagtcggaagctcccggggacgacgct 6900
 L G S L R T A Q T Q L S R K L P G T T L

Конец ОРФ TERT человека

6901 gactgccctggaggccgcagcacaaccggcactgcccctcagacttcaagaccatcctgga 6960
 T A L E A A A N P A L P S D F K T I L D

> XbaI BglII < терминатор эукариот

6961 ctaataaatctagaagatctttttccctctgccaataattatggggacatcatgaagcccc 7020
 □ □

Сигнальная последовательность полиА

7021 ttgagcatctgacttctggttaataaaggaaatttattttcattgcaatagtgtgttggaa 7080

терминатор эукариот > NotI

7081 attttttgtgtctctcactcggaaggacataaggggcgcc 7120

Фиг. 16

```

< Убиквитин человека
-----|-----|-----|-----|
 1 atgcagattttcgtcaaaaacattgacaggaaagaccatcacactggaagt 50
 1 M Q I F V K T L T G K T I T L E V 17

-----|-----|-----|-----|
51 ggagccaagcgacactattgagaacgtcaagccaagattcaggacaagg 100
18 E P S D T I E N V K A K I Q D K E 34

-----|-----|-----|-----|
101 agggcatcccaccagaccagcagaggtgatTTTTGCCGAAAGCAGCTG 150
35 G I P P D Q Q R L I F A G K Q L 50

-----|-----|-----|-----|
151 gaggacggacgcacactcagtgactacaatatccagaagaaagtactct 200
51 E D G R T L S D Y N I Q K E S T L 67
      Убиквитин человека ><hTERT
-----|-----|-----|-----|
201 gcatctggtccttcgctgcgcggcggaactggccaccttcgtgcccggcc 250
68 H L V L R L R G G L A T F V R R E 84

-----|-----|-----|-----|
251 tgggaccccagggtggcggtggtgcagcggggaccctgctgcttcc 300
85 G P Q G W R L V Q R G D P A A F 100

-----|-----|-----|-----|
301 agagctctcgtcgcaccagtgctctggtctcgttctctgggacgcacggcc 350
101 R A L V A Q C L V C V P W D A R P 117

-----|-----|-----|-----|
351 cccaccgcgcgccccagtttccggcaggtgagttgtctcaaagagttgg 400
118 P P A A P S F R Q V S C L K E L V 134

-----|-----|-----|-----|
401 ttgctcgggtgttgccagcggctttgtgaaaggggagcaagaacgtcctt 450
135 A R V L Q R L C E R G A K N V L 150

-----|-----|-----|-----|
451 gcctttggcttcgctttgctcgcgatggagcagcggaggccctcctgagggc 500
151 A F G F A L L D G A R G G P P E A 167

-----|-----|-----|-----|
501 attcactactagcgtccggtcctacctgcccacacagtgaccgacgctc 550
168 F T T S V R S Y L P N T V T D A L 184

-----|-----|-----|-----|
551 tgagaggttcagggtgcctgggtctgctgctgcccggagggtgggtgatgat 600
185 R G S G A W G L L L R R V G D D 200

-----|-----|-----|-----|
601 gttctggttcacctcctggcccgggtgtgcctgttcgtgctggtggctcc 650
201 V L V H L L A R C A L E V L V A P 217

-----|-----|-----|-----|
651 ctctcgcgcataaccaggtctgcggacccccactttatcagctcggcgctg 700
218 S C A Y Q V C G P P L Y Q L G A A 234

-----|-----|-----|-----|
701 ctactcaggcccgcaccaccacaagcctcaggtcacaagacgcccggctg 750
235 T Q A R P P P H A S G P R R R L 250

-----|-----|-----|-----|
751 ggtgccaacgggcatggaatcatagcgtgcccggaggcaggtgtgcctct 800
251 G C E R A W N H S V R E A G V P L 267

```

```

-----|-----|-----|-----|-----|
801 eggcctgccagcccccgagcaaggagacgggtggatccgccagtcgct 850
268 G L P A P G A R R R G G S A S R S 284

-----|-----|-----|-----|-----|
851 cactccccttgccctaagaggccaagaagaggagccgccctgaaccggag 900
285 L P L P K R P R R G A A P E P E 300

-----|-----|-----|-----|-----|
901 agaacacctgtcggccagggctcctgggctcaccccggaaggaccagggg 950
301 R T P V G Q G S W A H P G R T R G 317

-----|-----|-----|-----|-----|
951 cccaagcgataggggcttctgtgtgtgtcaccagccaggcctgccgaag 1000
318 P S D R G F C V V S P A R P A E E 334

-----|-----|-----|-----|-----|
1001 aggctacctccttggaggagccctcagtgccaccagcattctcatcca 1050
335 A T S L E G A L S G T R H S H P 350

-----|-----|-----|-----|-----|
1051 tctgtgggtaggcagcatcatgccggccccccctctacaagcagacctcc 1100
351 S V G R Q H H A G P P S T S R P P 367

-----|-----|-----|-----|-----|
1101 cagaccttgggacacaccctgccaccagtgatgccgagaccaagcact 1150
368 R P W D T P C P P V Y A E T K H F 384

-----|-----|-----|-----|-----|
1151 ttttgtattccagtgccgataaagagcagctccggccctcttttctgctc 1200
385 L Y S S G D K E Q L R P S F L L 400

-----|-----|-----|-----|-----|
1201 teaagcctccgcccctctctgaccggagctcgcaggctgggtggagccat 1250
401 S S L R P S L T G A R R L V E T I 417

-----|-----|-----|-----|-----|
1251 ctttctgggctcaagaccatggatgccaggcacccccgcgagactgccca 1300
418 F L G S R P W M P G T P R R L P R 434

-----|-----|-----|-----|-----|
1301 ggctccccagcggctactggcagatgccccctctctttctggaactctg 1350
435 L P Q R Y W Q M R P L F L E L L 450

-----|-----|-----|-----|-----|
1351 ggtaaccacgccagtgcccatatggcgtcctgctgaagaccactgtcc 1400
451 G N H A Q C P Y G V L L K T H C P 467

-----|-----|-----|-----|-----|
1401 tctgagggccgctgacccagccgggtgtgtgtgctagagaaaaac 1450
468 L R A A V T P A A G V C A R E K P 484

-----|-----|-----|-----|-----|
1451 ccagggtcagtggtgcacctgaagaggagacactgacctcggcgc 1500
485 Q G S V A A P E E E D T D P R R 500

-----|-----|-----|-----|-----|
1501 cttgtccagttgctcaggcagcattcatcaccatggcaggtgtacggctt 1550
501 L V Q L L R Q H S S P W Q V Y G F 517

-----|-----|-----|-----|-----|
1551 cgtgagggcttgccctgaggagactggcccccccgattgtggggatctc 1600
518 V R A C L R R L V P P G L W G S R 534

-----|-----|-----|-----|-----|
1601 ggcacaacgaacggcgtttctgaggaatacaagaagtttatctcctcg 1650
535 H N E R R F L R N T K K F I S L 550

```

```

-----|-----|-----|-----|-----|
1651 ggcaagcatgcaaagctcagcttgcaggagctgacatggaagatgagcgt 1700
551 G K H A K L S L Q E L T W K M S V 567

-----|-----|-----|-----|-----|
1701 tagaggatgctcagctcaggcgggtcacctggagttggatgcttccag 1750
568 R G C A W L R R S P G V G C V P A 584

-----|-----|-----|-----|-----|
1751 cagcagagcacaggctgctgcaagagattctcgcaaagtccctgcaactgg 1800
585 A E H R L R E E I L A K F L H W 600

-----|-----|-----|-----|-----|
1801 cttatgagcgtctacgtggctggaactgctgctgctttcttctacgtgac 1850
601 L M S V Y V V E L L R S F F Y V T 617

-----|-----|-----|-----|-----|
1851 agagaccacttttcagaagaacagactggttctctacaggaagtccgtct 1900
618 E T T F Q K N R L F F Y R K S V W 634

-----|-----|-----|-----|-----|
1901 ggagcaagctccagagtattggtattagacagcaccttaagagagttcag 1950
635 S K L Q S I G I R Q H L K R V Q 650

-----|-----|-----|-----|-----|
1951 cttagagagctgtccgaagctgaagtcggccagcaccgcaagctcggcc 2000
651 L R E L S E A E V R Q H R E A R P 667

-----|-----|-----|-----|-----|
2001 cggcctcctgacctctcggctgctggtttattcccaaaccgatggcctta 2050
668 A L L T S R L R F I P K P D G L R 684

-----|-----|-----|-----|-----|
2051 gacctatcgtgaatatggattacgtcgtgggtgcccgcactttcagaagg 2100
685 P I V N M D Y V V G A R T F R R 700

-----|-----|-----|-----|-----|
2101 gagaagcgcgcccagagagactgacatctcgcgtgaaggcactttttctgt 2150
701 E K R A E R L T S R V K A L F S V 717

-----|-----|-----|-----|-----|
2151 gcttaattatgaaagagcccgcagacctggtcttctcggagccagcgtgc 2200
718 L N Y E R A R R P G L L G A S V L 734

-----|-----|-----|-----|-----|
2201 tcggcctggatgatatccatcgggcttggcgcacctttgtgcttcgggtg 2250
735 G L D D I H R A W R T F V L R V 750

-----|-----|-----|-----|-----|
2251 agggcacaggatcctcctcctgagctttatttgtgaaagttgatgttac 2300
751 R A Q D P P P E L Y F V K V D V T 767

-----|-----|-----|-----|-----|
2301 tgggtgcttacgatacaatccctcaggaccggctcaccgaggtgatcgct 2350
768 G A Y D T I P Q D R L T E V I A S 784

-----|-----|-----|-----|-----|
2351 ctattatcaaaccagagaacacctactgcgtgagaaggtacgccgtcgctt 2400
785 I I K P Q N T Y C V R R Y A V V 800

-----|-----|-----|-----|-----|
2401 cagaaagccgcacacggacacgtgcccgaagctttcaaatcccacgtgctc 2450
801 Q K A A H G H V R K A F K S H V S 817

-----|-----|-----|-----|-----|
2451 taccttgacagacctccagccttatatggcggcagtttctgcacacctgc 2500
818 T L T D L Q P Y M R Q F V A H L Q 834

```

```

-----|-----|-----|-----|-----|
2501 aggagactagccccttgagggaagctgtggtcacggaacagtcacagctct 2550
835 E T S P L R D A V V I E Q S S S 850

-----|-----|-----|-----|-----|
2551 ctcaatgaggcatcctcaggcctggttgatgtgttcctgcgctttatgtg 2600
851 L N E A S S G L F D V F L R F M C 867

-----|-----|-----|-----|-----|
2601 ccaccacgcgcgtgaggattaggggcaagcttaccgtgcagtgccagggca 2650
868 H H A V R I R G K S Y V Q C Q G I 884

-----|-----|-----|-----|-----|
2651 tcccacagggtagcactcctgagcacactgctgtgtagcctgtgetatggc 2700
885 P Q G S I L S T L L C S L C Y G 900

-----|-----|-----|-----|-----|
2701 gatatggagaataaattgttcgcccggatcagaagattcctgctggttac 2750
901 D M E N K L F A G I R R F L L V T 917
*

-----|-----|-----|-----|-----|
2751 ccccatctgactcatgcaaaaacattttgcccactctggttagggcg 2800
918 P H L T H A K T F L R T L V R G V 934

-----|-----|-----|-----|-----|
2801 tgccagagtatggctgtgtgtgaatttgccgaaaactgtggttaatttc 2850
935 P E Y G C V V N L R K T V V N F 950

-----|-----|-----|-----|-----|
2851 ccagtgaggacgaagctctcggaggcacagcttttgttcagatgcctgc 2900
951 P V E D E A L G G T A F V Q M P A 967

-----|-----|-----|-----|-----|
2901 ccaggcctgttcccatggtgcccactgctgctcgatacccggaccctcg 2950
968 H G L F P W C G L L L D T R T L E 984

-----|-----|-----|-----|-----|
2951 agtgagctccgattatagttcctatgcaagaacatcaattcgggctagc 3000
985 V Q S D Y S S Y A R T S I R A S 1000

-----|-----|-----|-----|-----|
3001 ctgactttcaacagggccttcaaggcccggcaatagagaaggaaaact 3050
1001 L T F N R G E K A G R N M R R K L 1017

-----|-----|-----|-----|-----|
3051 gttcggagtgttgagacttaagtgcatagctcttttttgacttgcagg 3100
1018 F G V L R L K C H S L F L D L Q V 1034

-----|-----|-----|-----|-----|
3101 tcaattctctccagacagtggtgtaccaacatttataaaaatcctctgtg 3150
1035 N S L Q T V C T N I Y K I L L L 1050

-----|-----|-----|-----|-----|
3151 caggcttacagattccatgcctgcctcctgcagctgcctttccaccagca 3200
1051 Q A Y R F H A C V L Q L P F H Q Q 1067

-----|-----|-----|-----|-----|
3201 ggtgtggaaaaaccctaccttctctcctgcccgtgattagcgaaccgcca 3250
1068 V W K N P T F F L R V I S D T A S 1084

-----|-----|-----|-----|-----|
3251 gtctttgctactccatcttgaaagcaaaaaacgctggeatgagcttggga 3300
1085 L C Y S I L K A K N A G M S L G 1100

-----|-----|-----|-----|-----|
3301 gctaaggcgcgcctggacctctgccagtgaaagcagtcacagtggtgtg 3350
1101 A K G A A G P L P S E A V Q W L C 1117

```

```

-----|-----|-----|-----|-----|
3351 tcatcaggetttcctccttaactgacacgcccacggcgtgacttaagtc 3400
1118 H Q A F L L K L T R H R V T Y V P 1134

-----|-----|-----|-----|-----|
3401 cactcctgggctccctgagaactgctcagaccagctttcccgaagctt 3450
1135 L L G S L R T A Q T Q L S R K L 1150

-----|-----|-----|-----|-----|
3451 ccaggcactacccttacgcactcgaagcagccgcdaaccctgccctgcc 3500
1151 P G T T L T A L E A A A N P A L P 1167
                               hTERT<< Ter V5
-----|-----|-----|-----|-----|
3501 ctccgactttaagactatcctggacggcgaagccaattcctaatecattgc 3550
1168 S D F K T I L D G K P I P N P L L 1184
                               > СТОП
-----|-----|
3551 tgggcctggactcaacttga 3570
1185 G L D S T □ 1189

```

Фиг. 17

```

< Убиквитин человека
-----|-----|-----|-----|-----|
 1 atgcagattttcgtcaaaacattgacaggaaagaccatcacactggaagt 50
 1 M Q I F V K T L T G K T I T L E V 17

-----|-----|-----|-----|-----|
51 ggagccaagcgacactattgagaacgtcaagccaagattcaggacaagg 100
18 E P S D T I E N V K A K I Q D K E 34

-----|-----|-----|-----|-----|
101 agggcatcccaccagaccagcagaggctgatttttgccgaaagcagctg 150
35 G I P P D Q Q R L I F A G K Q L 50

-----|-----|-----|-----|-----|
151 gaggacggacgcacactcagtgactacaatatccagaagaaagtactct 200
51 E D G R T L S D Y N I Q K E S T L 67
      Убиквитин человека >> hTERT
-----|-----|-----|-----|-----|
201 gcatctggtccttcgctcgcggcggaactggccaccttcgtgcgggccc 250
68 H L V L R L R G G L A T F V R R L 84

-----|-----|-----|-----|-----|
251 tgggaccccagggtggcggtggtgcagcggggaccctgctgctttc 300
85 G P Q G W R L V Q R G D P A A F 100

-----|-----|-----|-----|-----|
301 agagctctcgtcgcaccagtgctcgtcgtcgttccttgggacgcacggcc 350
101 R A L V A Q C L V C V P W D A R P 117

-----|-----|-----|-----|-----|
351 cccacccgcccggcccccagtttcggcagggtgagttgtctcaagagttgg 400
118 P P A A P S F R Q V S C L K E L V 134

-----|-----|-----|-----|-----|
401 ttgctcgggtggtgcagcggctttgtgaaaggggagcaagaacgtcctt 450
135 A R V L Q R L C E R G A K N V L 150

-----|-----|-----|-----|-----|
451 gcctttggcttcgctttgctcgtatggagcagcggaggccctcctgaggc 500
151 A F G F A L L D G A R G G P P E A 167

-----|-----|-----|-----|-----|
501 attcactactagegtccggtcctacctgcccacacagtgaccgacgctc 550
168 F T T S V R S Y L P N T V T D A L 184

-----|-----|-----|-----|-----|
551 tgagaggttcagggtcctgggtcgtcgtcgtcggagggtgggtgatgat 600
185 R G S G A W G L L L R R V G D D 200

-----|-----|-----|-----|-----|
601 gttctgggtcacctcctggcccgggtgtgcctgttcgtcgtcgtggctcc 650
201 V L V H L L A R C A L F V L V A P 217

-----|-----|-----|-----|-----|
651 ctctcggcataaccaggctcgcggaccccactttatcagctcggcgtg 700
218 S C A Y Q V C G P P L Y Q L G A A 234

-----|-----|-----|-----|-----|
701 ctactcaggcccggcccaccaccacagcctcagggtccaagacggcggctg 750
235 T Q A R P P P H A S G P R R R L 250

-----|-----|-----|-----|-----|
751 ggctgcgaacgggcatggaatcatagcgtcgggaggcagggtgctcctc 800
251 G C E R A W N H S V R E A G V P L 267

```

```

-----|-----|-----|-----|-----|
801 cggcctgccagcccccggagcaaggagacgcggtggatccgccagtccgt 850
268 G L P A P G A R R R G G S A S R S 284

-----|-----|-----|-----|-----|
851 cactccccttgccctaagaggccaagaagaggagccgccctgaaccggag 900
285 L P L P K R P R R G A A P E P E 300

-----|-----|-----|-----|-----|
901 agaacacctgtcggccagggtcctcgggtccaccccgaaggaccagggg 950
301 R T P V G Q G S W A H P G R T R G 317

-----|-----|-----|-----|-----|
951 cccaagcgataggggettctgtgttggtcaccagccaggcctgccgaag 1000
318 P S D R G F C V V S P A R P A E E 334

-----|-----|-----|-----|-----|
1001 aggctacctccttgggaaggagccctcagtgggcaccagccattctcatcca 1050
335 A T S L E G A L S G T R H S H P 350

-----|-----|-----|-----|-----|
1051 tctgtgggtaggcagcatcatgccggccccccctctacaagcagacctcc 1100
351 S V G R Q H H A G P P S T S R P P 367

-----|-----|-----|-----|-----|
1101 cagaccttgggacacaccctgccaccagtgatgcccagaccaagcact 1150
368 R P W D T P C P P V Y A E T K H F 384

-----|-----|-----|-----|-----|
1151 ttttgtattccagtgccgataaagagcagctccggccctcttttctgctc 1200
385 L Y S S G D K E Q L R P S F L L 400

-----|-----|-----|-----|-----|
1201 tcaagcctccgccctctctgaccggagctcgcagcgtggaggagaccat 1250
401 S S L R P S L T G A R R L V E T I 417

-----|-----|-----|-----|-----|
1251 ctttctgggctcaagaccatggatgccaggcacccccgcagaactgccca 1300
418 F L G S R P W M P G T P R R L P R 434

-----|-----|-----|-----|-----|
1301 ggctccccagcggtaactggcagatgcccctctctttctggaactctcg 1350
435 L P Q R Y W Q M R P L F L E L L 450

-----|-----|-----|-----|-----|
1351 ggtaacacagcccagtgcccabatggcgtcctgctgaagaccactgtcc 1400
451 G N H A Q C P Y G V L L K T H C P 467

-----|-----|-----|-----|-----|
1401 tctgagggccgctgaccccagccgggtgtgtgtgctagagaaaaac 1450
468 L R A A V T P A A G V C A R E K P 484

-----|-----|-----|-----|-----|
1451 occagggtcagtggtgcacctgaagaggaggacactgacctcgccgc 1500
485 Q G S V A A P E E E D T D P R R 500

-----|-----|-----|-----|-----|
1501 cttgtccagttgctcaggcagcattcatcaccatggcaggtgtacggctt 1550
501 L V Q L L R Q H S S P W Q V Y G F 517

-----|-----|-----|-----|-----|
1551 cgtgagggcttgccctgcccagactggcccccccgattgtggggatctc 1600
518 V R A C L R R L V P P G L W G S R 534

-----|-----|-----|-----|-----|
1601 ggcacaacgaacggcgtttctgagggaatacaaaagaagtttatctccctg 1650
535 H N E R R F L R N T K K F I S L 550

```

```

-----|-----|-----|-----|-----|
1651 ggcaagcatgcaaagctcagcttgcaggagctgacatggaagatgagcgt 1700
551 G K H A K L S L Q E L T W K M S V 567

-----|-----|-----|-----|-----|
1701 tagaggatgcgcatggtcagggcgtcacctggagttggatgctgtccag 1750
568 R G C A W L R R S P G V G C V P A 584

-----|-----|-----|-----|-----|
1751 cagcagagcacaggctgcggaagagattctcgaaaagttcctgcaactgg 1800
585 A E H R L R E E I L A K F L H W 600

-----|-----|-----|-----|-----|
1801 cttatgagcgtctacgtggctgaactgctgcggtctttcttctacgtgac 1850
601 L M S V Y V V E L L R S F F Y V T 617

-----|-----|-----|-----|-----|
1851 agagaccacttttcagaagaacagactgttctctacaggaagtccgtct 1900
618 E T T F Q K N R L F F Y R K S V W 634

-----|-----|-----|-----|-----|
1901 ggagcaagctccagagtattggtattagacagcaccttaagagagttcag 1950
635 S K L Q S I G I R Q H L K R V Q 650

-----|-----|-----|-----|-----|
1951 cttagagagctgtccgaagctgaagtcggccagcaccgcaagctcgccc 2000
651 L R E L S E A E V R Q H R E A R P 667

-----|-----|-----|-----|-----|
2001 cgccctcctgacctctcggtgctgggttattccaaaaccgatggcctta 2050
668 A L L T S R L R F I P K P D G L R 684

-----|-----|-----|-----|-----|
2051 gacctatcgtgaatatggattacgtcgtgggtgccgcacttccagaag 2100
685 P I V N M D Y V V G A R T F R R 700

-----|-----|-----|-----|-----|
2101 gagaagcgcgcgagagactgacatctcggctgaaggcactttttctgt 2150
701 E K R A E R L T S R V K A L F S V 717

-----|-----|-----|-----|-----|
2151 gcttaattatgaagagccgcagacctggcttctcggagccagcgtgc 2200
718 L N Y E R A R R P G L L G A S V L 734

-----|-----|-----|-----|-----|
2201 tcggcctggatgatatccatcggccttggcgcaccttctgtctcgggtg 2250
735 G L D D I H R A W R T F V L R V 750

-----|-----|-----|-----|-----|
2251 agggcacaggatcctcctcctgagctttatgtgaaagttgatgttac 2300
751 R A Q D P P P E L Y F V K V D V T 767

-----|-----|-----|-----|-----|
2301 tggtgcttacgataacaatccctcaggaccggctcaccgaggtgatgcct 2350
768 G A Y D T I P Q D R L T E V I A S 784

-----|-----|-----|-----|-----|
2351 ctattatcaaacccagaacacctactgcgtgagaaggtacgccgtcgtt 2400
785 I I K P Q N T Y C V R R Y A V V 800

-----|-----|-----|-----|-----|
2401 cagaaaagccgcacacggacagctgcgcaagctttcaaatccacgtgtc 2450
801 Q K A A H G H V R K A F K S H V S 817

-----|-----|-----|-----|-----|
2451 taccttgacagacctccagccttatatgcggcagtttctgcaacacgtgc 2500
818 T L T D L Q P Y M R Q F V A H L Q 834

```

```

-----|-----|-----|-----|-----|
2501 aggagactagccccttgaggggacgctgtggtcatogaacagtcagctct 2550
835 E T S P L R D A V V I E Q S S S 850

-----|-----|-----|-----|-----|
2551 ctcaatgaggcatcctcaggcctgtttgatgtgttctcgcgctttatgtg 2600
851 L N E A S S G L F D V F L R F M C 867

-----|-----|-----|-----|-----|
2601 ccaccacgcctgcggtattaggggcaagtcttacgtgcagtgccagggca 2650
868 H H A V R I R G K S Y V Q C Q G I 884

-----|-----|-----|-----|-----|
2651 tcccacagggtagcatcctcagcacactgctgtgtagcctgtgctatggc 2700
885 P Q G S I L S T L L C S L C Y G 900

-----|-----|-----|-----|-----|
2701 gatatggagaataaattgttcgccggtatcagaagagacggtttgctcct 2750
901 D M E N K L F A G I R R D G L L L 917

-----|-----|-----|-----|-----|
2751 gaggctgctgactcatgccaaaacatttttgcggactctggttagggcg 2800
918 R L L T H A K T F L R T L V R G V 934
*

-----|-----|-----|-----|-----|
2801 tgccagagtatggctgtgttgaatttgcggaaaactgtggtaatttc 2850
935 P E Y G C V V N L R K T V V N F 950

-----|-----|-----|-----|-----|
2851 ccagtgaggacgaagctctcggaggcacagcttttgttcagatgcctgc 2900
951 P V E D E A L G G T A F V Q M P A 967

-----|-----|-----|-----|-----|
2901 ccacggcctgttcccattggtcggactgctgctegataaccggaccctcg 2950
968 H G L F P W C G L L L D T R T L E 984

-----|-----|-----|-----|-----|
2951 aggtgcagtcagattatagttcctatgcaagaacatcaattcgggctagc 3000
985 V Q S D Y S S Y A R T S I R A S 1000

-----|-----|-----|-----|-----|
3001 ctgactttcaacaggggcttcaaggccggcgggaatagagaaggaaact 3050
1001 L T F N R G F K A G R N M R R K L 1017

-----|-----|-----|-----|-----|
3051 gttcggagtgttgagacttaagtgtcatagtcttttttggacttgcagg 3100
1018 F G V L R L K C H S L F L D L Q V 1034

-----|-----|-----|-----|-----|
3101 tcaattctctccagacagtggtgtaccaacatttataaaaatcctcttctg 3150
1035 N S L Q T V C T N I Y K I L L L 1050

-----|-----|-----|-----|-----|
3151 caggcttacagattccatgcctgcgtcctgcagctgcctttccaccagca 3200
1051 Q A Y R F H A C V L Q L P F H Q Q 1067

-----|-----|-----|-----|-----|
3201 ggtgtggaaaaaccctaccttcttctcctgcccgggtgattagcgacaccgca 3250
1068 V W K N P T F F L R V I S D T A S 1084

-----|-----|-----|-----|-----|
3251 gtctttgctactccatcttgaaagcaaaaaacgctggcatgagcttggga 3300
1085 L C Y S I L K A K N A G M S L G 1100

-----|-----|-----|-----|-----|
3301 gctaagggcgcctggaacctctgccagtgaaagcagtcagtggtctgtg 3350
1101 A K G A A G P L P S E A V Q W L C 1117

```

```

-----|-----|-----|-----|
3351 tcatcagggttttcctccttaactgacacgccaccgctgacttacgtcc 3400
1118 H Q A F L L K L T R H R V T Y V P 1134

-----|-----|-----|-----|
3401 cactcctgggctccctgagaactgctcagaccagctttcccggaagctt 3450
1135 L L G S L R T A Q T Q L S R K L 1150

-----|-----|-----|-----|
3451 ccaggcactacccttacccgcaactcgaagcagccgccaaccctgccctgcc 3500
1151 P G T T L T A L E A A A N P A L P 1167
      hTERT<< Ter V5
-----|-----|-----|-----|
3501 ctccgactttaagactatcctggacggcgaagccaattcctaaccattgc 3550
1168 S D F K T I L D G K P I P N P L L 1184
      >СТОП
-----|-----|
3551 tgggcctggactcaacttga 3570
1185 G L D S T □ 1189

```

Фиг. 18

```

< Убиквитин человека
-----|-----|-----|-----|-----|
1 atgcagatttttcgtcaaaaacattgacagggaaagaccatcacactggaagt 50
1 M Q I F V K T L T G K T I T L E V 17

-----|-----|-----|-----|-----|
51 ggagccaagcgacactattgagaacgtcaaagccaagattcaggacaagg 100
18 E P S D T I E N V K A K F Q D K E 34

-----|-----|-----|-----|-----|
101 agggcatcccaccagaccagaggetgatttttgccggaagcagctg 150
35 G I P P D Q Q R L I F A G K Q L 50

-----|-----|-----|-----|-----|
151 gaggacggacgcacactcagtgactacaatatccagaaggaaagtactct 200
51 E D G R T L S D Y N I Q K E S T L 67
Убиквитин человека >< hTERT

-----|-----|-----|-----|-----|
201 gcattctggctccttcgctgcgcggcggactggccaccttcgtgcccggcc 250
68 H L V L R L R G G L A T F V R R L 84

-----|-----|-----|-----|-----|
251 tgggaccccagggctggcggctggtgcagcggggaccctgctgctttc 300
85 G P Q G W R L V Q R G D P A A F 100

-----|-----|-----|-----|-----|
301 agagctctctgctgcaccagtgctggtctgctgcttcttgggacgcacggcc 350
101 R A L V A Q C L V C V P W D A R P 117

-----|-----|-----|-----|-----|
351 cccacccgcgcgccccagtttcgggcaggtagttgtctcacaagagttgg 400
118 P P A A P S F R Q V S C L K E L V 134

-----|-----|-----|-----|-----|
401 ttgctcgggtggttcagcggctttgtgaaaggggagcaagaacgctcct 450
135 A R V L Q R L C E R G A K N V L 150

-----|-----|-----|-----|-----|
451 gcctttggcttcgcttgcctgcatggagcacgcggaggccctcctgaggc 500
151 A F G F A L L D G A R G G P P E A 167

-----|-----|-----|-----|-----|
501 attcactactagcgtccggctcctacctgcccacaacagtgaccgacgctc 550
168 F T T S V R S Y L P N T V T D A E 184

-----|-----|-----|-----|-----|
551 tgagaggttcaggtgcctggggtctgctgctgcccagggtgggtgatgat 600
185 R G S G A W G L L L R R V G D D 200

-----|-----|-----|-----|-----|
601 gttctgggttcacctcctggcccgggtgcccctgttcgtgctgggtggctcc 650
201 V L V H L L A R C A L F V L V A P 217

-----|-----|-----|-----|-----|
651 ctctcggcgcataaccaggtctgcggacccccactttatcagctcggcgtg 700
218 S C A Y Q V C G P P L Y Q L G A A 234

-----|-----|-----|-----|-----|
701 ctactcaggccccgccaccaccacacgcctcaggtccaagaagccggctg 750
235 T Q A R P P P H A S G P R R R L 250

-----|-----|-----|-----|-----|
751 ggctcgaacgggcatggaatcatagcgtgcccaggcaggtgtgcctct 800
251 G C E R A W N H S V R E A G V P L 267

```

```

-----|-----|-----|-----|-----|
801 cggcctgccagcccccgagcaaggagacgggtggatccgccagtcgct 850
268 G L P A P G A R R R G G S A S R S 284

-----|-----|-----|-----|-----|
851 cactcccccttgccctaagaggccaagaagaggagccgccctgaacccgag 900
285 L P L P K R P R R G A A P E P E 300

-----|-----|-----|-----|-----|
901 agaacacctgtcgccagggctcctgggctcaccgccgaaggaccaggg 950
301 R T P V G Q G S W A H P G R T R G 317

-----|-----|-----|-----|-----|
951 cccaagcgataggggcttctgtgtgtgtcaccagccagccctgccgaag 1000
318 P S D R G F C V V S P A R P A E E 334

-----|-----|-----|-----|-----|
1001 aggctacctccttggaggagccctcagtgccaccaggcattctcatcca 1050
335 A T S L E G A L S G T R H S H P 350

-----|-----|-----|-----|-----|
1051 tctgtgggtaggcagcatcatgccggccccccctctacaagcagacctcc 1100
351 S V G R Q H H A G P P S T S R P P 367

-----|-----|-----|-----|-----|
1101 cagaccttgggacacacctgccaccagtgatgccgagaccaagcaact 1150
368 R P W D T P C P P V Y A E T K H F 384

-----|-----|-----|-----|-----|
1151 tttgtattccagtgccgataaagagcagctccggccctcttttctgtctc 1200
385 L Y S S G D K E Q L R P S F L L 400

-----|-----|-----|-----|-----|
1201 tcaagcctccgccctctctgaccggagctcgcaggtgggtggagaccat 1250
401 S S L R P S L T G A R R L V E T I 417

-----|-----|-----|-----|-----|
1251 ctttctgggctcaagaccatggatgccagggcccccccgagactgccc 1300
418 F L G S R P W M P G T P R R L P R 434

-----|-----|-----|-----|-----|
1301 ggcctcccagcggctactggcagatgccccctctctttctggaacttctg 1350
435 L P Q R Y W Q M R P L P L E L L 450

-----|-----|-----|-----|-----|
1351 ggtaaccacgcccagtgcccatatggcgctcctgctgaagaccactgtcc 1400
451 G N H A Q C P Y G V L L K T H C P 467

-----|-----|-----|-----|-----|
1401 tctgagggcccgctgaccccagcccggtgtgtgtctagagaaaaac 1450
468 L R A A V T P A A G V C A R E K P 484

-----|-----|-----|-----|-----|
1451 cccagggctcagtggtgcacctgaagaggaggacactgacctcgccgc 1500
485 Q G S V A A P E E E D T D P R R 500

-----|-----|-----|-----|-----|
1501 cttgtccagttgctcaggeagcattcatcaccatggcaggtgtacggctt 1550
501 L V Q L L R Q H S S P W Q V Y G F 517

-----|-----|-----|-----|-----|
1551 cgtgagggcttgcctgcccagactggtcccccccgattgtggggatctc 1600
518 V R A C L R R L V P P G L W G S R 534

-----|-----|-----|-----|-----|
1601 ggcacaacgaacggcgctttctgaggaatacaagaagtatatctccctg 1650
535 H N E R R F L R N T K K F I S L 550

```

```

-----|-----|-----|-----|-----|
1651 ggcaagcatgcaaagctcagcttgaggagctgacatggaagatgagcgt 1700
551 G K H A K L S L Q E L T W K M S V 567

-----|-----|-----|-----|-----|
1701 tagaggatggcatggctcaggcggctcaactggagttggatgogttccag 1750
568 R G C A W L R R S P G V G C V P A 584

-----|-----|-----|-----|-----|
1751 cagcagagcacaggtgcgcaagagattctcgcaaagtctcactgag 1800
585 A E H R L R E E I L A K F L H W 600

-----|-----|-----|-----|-----|
1801 cttatgagcgtctacgtggcgaactgctgcggtctttctctacgtgac 1850
601 L M S V Y V V E L L R S F F Y V T 617

-----|-----|-----|-----|-----|
1851 agagaccacttttcagaagaacagactgtctctacaggaagtccgtct 1900
618 E T T E Q K N R L F F Y R K S V W 634

-----|-----|-----|-----|-----|
1901 ggagcaagctccagagtattggattagacagcaccttaagagagttcag 1950
635 S K L Q S I G I R Q H L K R V Q 650

-----|-----|-----|-----|-----|
1951 cttagagagctgtccgaagctgaagtcgccagaccgccgaagctcgccc 2000
651 L R E L S E A E V R Q H R E A R P 667

-----|-----|-----|-----|-----|
2001 cgcctctctgacctctcggctgcggtttattcccaaacccgatggcctta 2050
668 A L L T S R L R F I P K P D G L R 684

-----|-----|-----|-----|-----|
2051 gaectatcgtgaatatggattacgtcgtgggtgccgcactttcagaagg 2100
685 P L V N M D Y V V G A R T F R R 700

-----|-----|-----|-----|-----|
2101 gagaagcggcggagagactgacatctcgcgtgaaggcactttttctgt 2150
701 E K R A E R L T S R V K A L F S V 717

-----|-----|-----|-----|-----|
2151 gcttaattatgaagagcccgcagacctggtctctcggagccagcgtgc 2200
718 L N Y E R A R R P G L L G A S V L 734

-----|-----|-----|-----|-----|
2201 tcggcctggatgatatccatcgggcttgccgcacctttgtgcttcgggtg 2250
735 G L D D I H R A W R T F V L R V 750

-----|-----|-----|-----|-----|
2251 agggcacaggatcctcctcctgagctttatttgtgaaagttgatgttac 2300
751 R A Q D P P P E L Y F V K V D V T 767

-----|-----|-----|-----|-----|
2301 tgggtcttacgataacaatccctcaggaccggctcaccgaggtgatcgct 2350
768 G A Y D T I P Q D R L T E V I A S 784

-----|-----|-----|-----|-----|
2351 ctattatcaaaccacagaacacctactgctgagaaggtacgcgctcgtt 2400
785 I I K P Q N T Y C V R R Y A V V 800

-----|-----|-----|-----|-----|
2401 cagaaagccgcacacggacacgtgcgcaaagctttcaaatcccacgtgct 2450
801 Q K A A H G H V R K A F K S H V S 817

-----|-----|-----|-----|-----|
2451 taccttgacagacctccagccttatatgcccagtttgcgcacacctgc 2500
818 T L T D L Q P Y M R Q F V A H L Q 834

```

```

-----|-----|-----|-----|-----|
2501 aggagactagccccttgagggacgctgtggtcatcgaacagttccagctct 2550
835 E T S P L R D A V V I E Q S S S 850

-----|-----|-----|-----|-----|
2551 ctcaatgaggcatcctcaggcctgtttgatgtgttctctgcgctttatgtg 2600
851 L N E A S S G L F D V F L R F M C 867

-----|-----|-----|-----|-----|
2601 ccaccacgcggtgaggattagggcaagtcttaactgagtgccagggca 2650
868 H H A V R I R G K S Y V Q C Q G I 884

-----|-----|-----|-----|-----|
2651 tcccacagggtagcatcctgagcacactgctgtgtagcctgtgctatggc 2700
885 P Q G S I L S T L L C S L C Y G 900

-----|-----|-----|-----|-----|
2701 gatatggagaataaattgttcgccgggtgcaaacatttttgcggactct 2750
901 D M E N K L F A G A K T F L R T L 917
*

-----|-----|-----|-----|-----|
2751 ggttagggcgtgccagagtatggctgtgttggaatttgcggaaaactg 2800
918 V R G V P E Y G C V V N L R K T V 934

-----|-----|-----|-----|-----|
2801 tggttaatttccagtgaggacgaagctctcggaggcacagcttttgtt 2850
935 V N F P V E D E A L G G T A F V 950

-----|-----|-----|-----|-----|
2851 cagatgcctgccacggcctgttccatggtgaggactgctgctcgatac 2900
951 Q M P A H G L F P W C G L L L D T 967

-----|-----|-----|-----|-----|
2901 ccggaccctcgaggtgcagtcagtcgattatagttcctatgcaagaacatcaa 2950
968 R T L E V Q S D Y S S Y A R T S I 984

-----|-----|-----|-----|-----|
2951 ttcgggtagcctgactttcaacaggggttcaaggccggcgggaatag 3000
985 R A S L T E N R G F K A G R N M 1000

-----|-----|-----|-----|-----|
3001 agaagaaactgttcggaggttgagacttaagtgtcatagcttttttt 3050
1001 R R K L F G V L R L K C H S L F L 1017

-----|-----|-----|-----|-----|
3051 ggacttgcaggtcaattctctccagacagtgtgtaccaacatttataaaa 3100
1018 D L Q V N S L Q T V C T N I Y K I 1034

-----|-----|-----|-----|-----|
3101 tctcttggctgcaggcttacagattccatgcctgcgctcctgcagctgct 3150
1035 L L L Q A Y R F H A C V L Q L P 1050

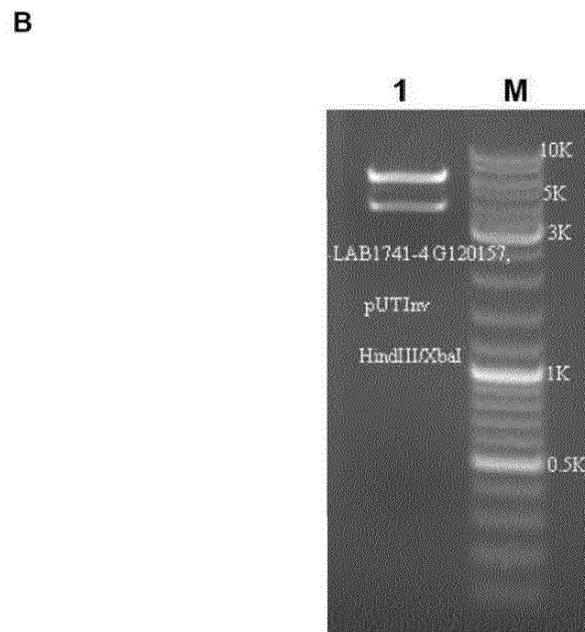
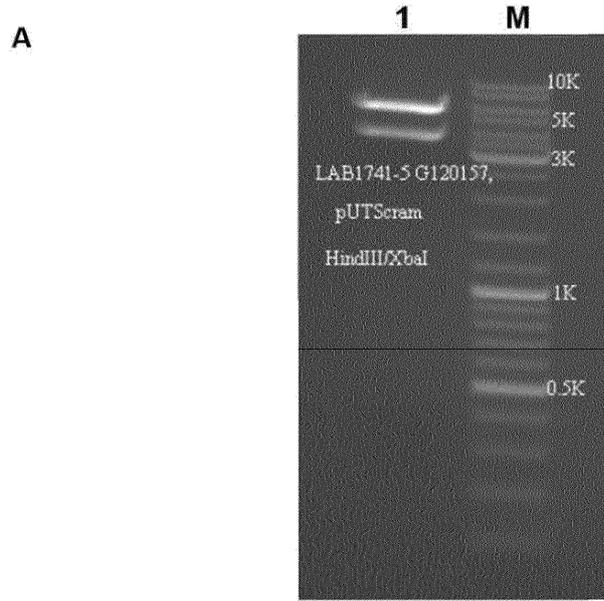
-----|-----|-----|-----|-----|
3151 ttccaccagcaggtgtggaaaaaccctaccttctctcctgcccgtgattag 3200
1051 E H Q Q V W K N P T F F L R V I S 1067

-----|-----|-----|-----|-----|
3201 cgacaccgcagctctttgctactccatcttgaaagcaaaaaacgctggca 3250
1068 D T A S L C Y S I L K A K N A G M 1084

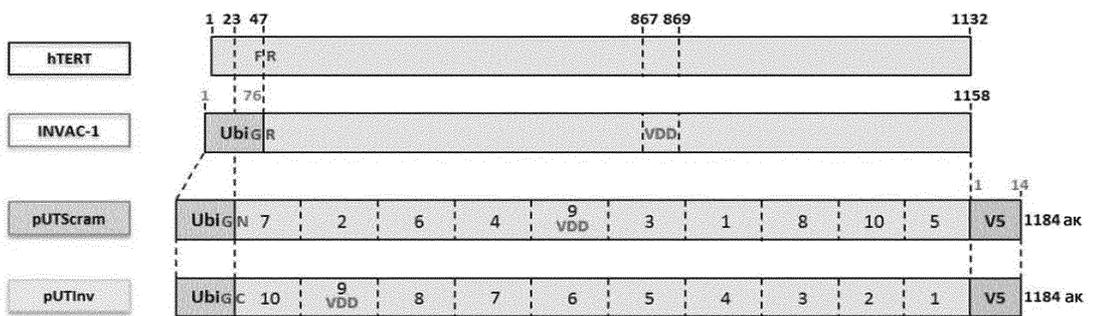
-----|-----|-----|-----|-----|
3251 tgagcttgggagctaaggcgcgctggactctgcccagtgagcagtc 3300
1085 S L G A K G A A G P L P S E A V 1100

-----|-----|-----|-----|-----|
3301 cagtggctgtgtcatcaggtttctccttaaaactgacacgccaccgct 3350
1101 Q W L C H Q A F L L K L T R H R V 1117

```

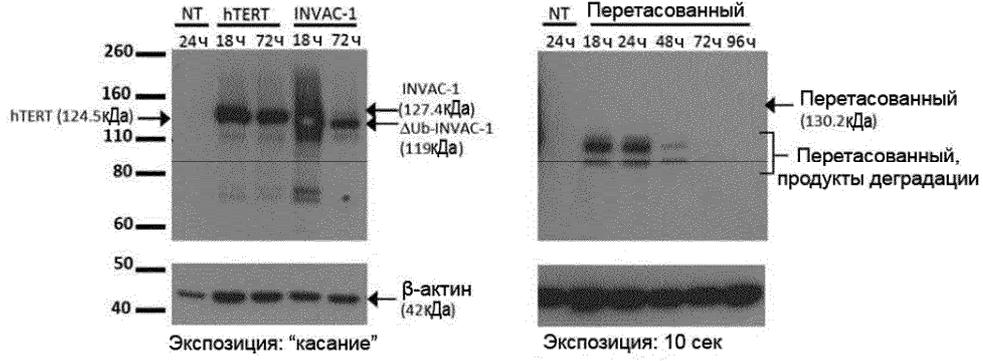



Фиг. 21

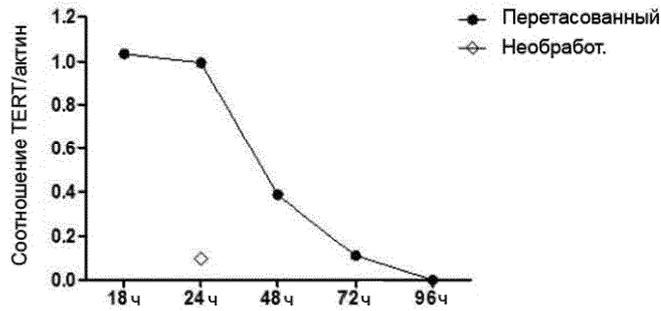


Фиг. 22

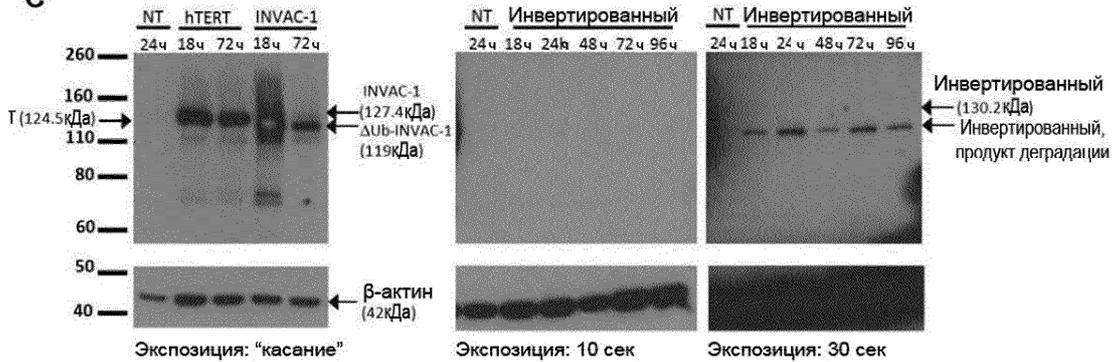
A



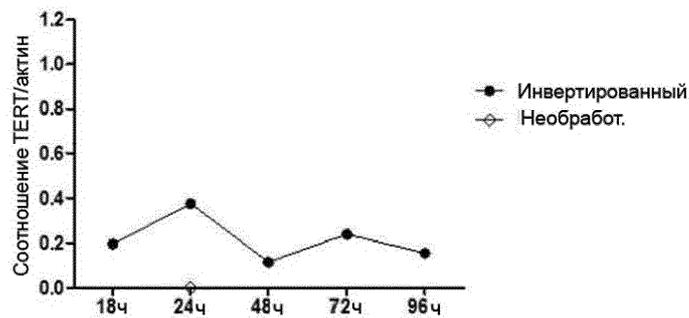
B



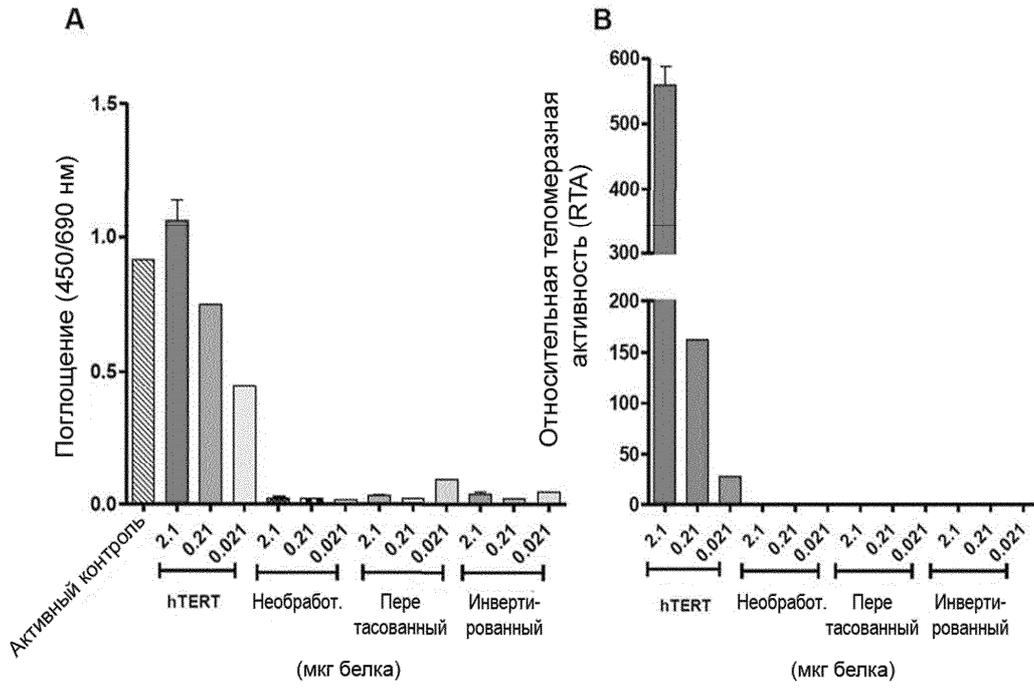
C



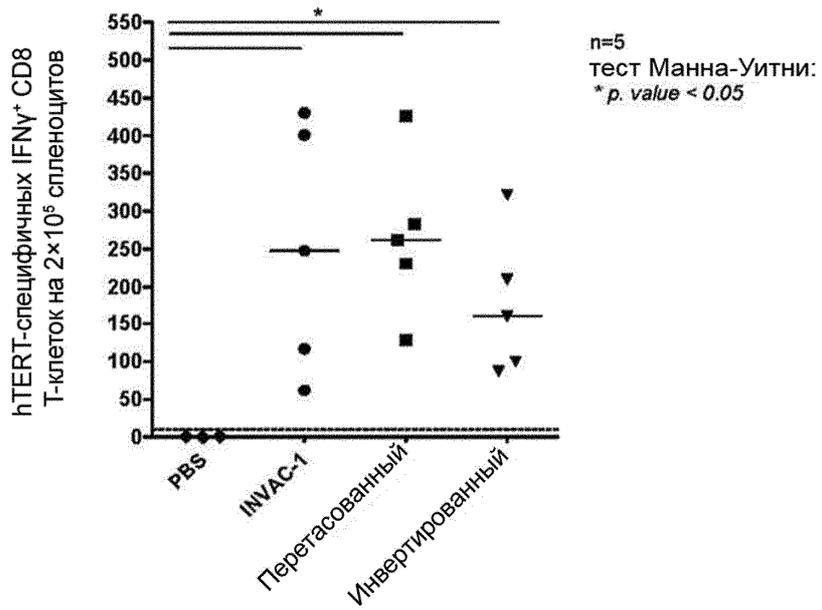
D



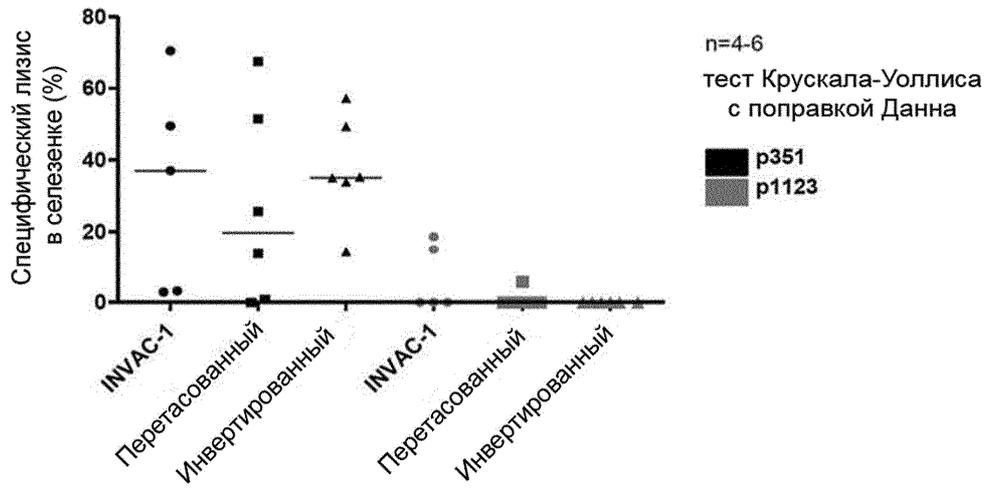
Фиг. 23



Фиг. 24



Фиг. 25



Фиг. 26

< Убиквитин человека

```

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
1  atgcagattttcgtcaaaaacattgacaggaagaccatcacactggaagtggagccaage 60
1  M Q I F V K T L T G K T I T L E V E P S 20

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
61  gacactattgagaacgtcaaagccaagattcaggacaaggaggatcccaccagaccag 120
21  D T I E N V K A K I Q D K E G I P P D Q 40

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
121  cagaggctgatTTTTGCGGAAAGCAGCTGGAGGACGGAACGCACTCAGTGACTACAAT 180
41  Q R L I P A G K Q L E D G R T L S D Y N 60

```

Убиквитин человека >< hTERT фрагмент 1

```

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
181  atccagaaggaagtaactctgcatctggctccttcgctcgcgggaggactggccaccttc 240
61  I Q K E S T L H L V L R L R G G L A T F 80

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
241  gtggggcgcatgggaccccagggtggcggtgggacagcgggggaccctgctgctttc 300
81  V R R L G P Q G W R L V Q R G D P A A F 100

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
301  agagctctcgtcgccagtgctgtgtgcttcccttgggacgcaogggcccccaccggcc 360
101  R A L V A Q C L V C V P W D A R P P P A 120

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
361  gccccagtttccggcaggtgagttgtctcaagagttggttgctcgggtggttcagcgg 420
121  A P S F R Q V S C L K E L V A R V L Q R 140

```

hTERT

```

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
421  ctttgtgaaaggggagcaagaacgtccttgccttggcttcgctttgctcggatggagca 480
141  L C E R G A K N V L A F G F A L L D G A 160

```

Фрагмент 1 >

< hTERT

Фрагмент 2

```

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
481  cgcgaggccctcctgaggcattcactactagcgtccggctcctacctgcccacacagtg 540
161  R G G P P E A F T T S V R S Y L P N T V 180

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
541  accgacgctctgagaggttcaggtgcctgggtctgctgctgcgagggtgggtgatgat 600
181  T D A L R G S G A W G L L L R R V G D D 200

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
601  gttctggttcacctcctggccccgggtgcccctggttcgctgctgggtgctccctcctgcgc 660
201  V L V H L L A R C A L F V L V A P S C A 220

```

hTERT Фрагмент 2 >

```

-----|-----|-----|-----|-----|
661 taccagggtctgcggaacccccactttatcagctcggcgctgctactcaggcccgcccacca 720
221 Y Q V C G P P L Y Q L G A A T Q A R P P 240

```

< **hTERT** Фрагмент 3

```

-----|-----|-----|-----|-----|
721 ccacacgcctcagggtccaagacgcggctgggctgccaacgggcatggaatcatagcgtg 780
241 P H A S G P R R R L G C E R A W N H S V 260

```

```

-----|-----|-----|-----|-----|
781 cgggaggcagggtgtgectctcggcctgccagccccggagcaaggagacgggtggatcc 840
261 R E A G V P L G L P A P G A R R R G G S 280

```

hTERT Фрагмент 3 >

```

-----|-----|-----|-----|-----|
841 gccagtcgctcaactccccttgcctaagaggccaagaagaggagcccgccctgaaccocag 900
281 A S R S L P L P K R P R R G A A P E P E 300

```

< **hTERT** Фрагмент 4

```

-----|-----|-----|-----|-----|
901 agaacacctgtcggccagggtcctgggctcaccocgggaaggaccaggggcccaagcagat 960
301 R T P V G Q G S W A H P G R T R G P S D 320

```

```

-----|-----|-----|-----|-----|
961 agggctctctgtgttgtgtcaccagccaggcctgccgaagaggtacctccttgggaagga 1020
321 R G F C V V S P A R P A E E A T S L E G 340

```

hTERT Фрагмент 4 >

```

-----|-----|-----|-----|-----|
1021 gccctcagtcggcaccaggcattctcatccatctgtgggtaggcagcatcatgccggcccc 1080
341 A L S G T R H S H P S V G R Q H H A G P 360

```

< **hTERT** Фрагмент 5

```

-----|-----|-----|-----|-----|
1081 cctctacaagcagacctcccagaccttgggacacacctgccaccagtgatgcccag 1140
361 P S T S R P P R P W D T P C P P V Y A E 380

```

```

-----|-----|-----|-----|-----|
1141 accaagcactttttgtattccagtcggcgataaagagcagctccggccctcttttctgctc 1200
381 T K H F L Y S S G D K E Q L R P S F L L 400

```

```

-----|-----|-----|-----|-----|
1201 tcaagcctccgcccctctctgaccggagctcgcaggctgggtggagaccatctttctgggc 1260
401 S S L R P S L T G A R R L V E T I F L G 420

```

```

-----|-----|-----|-----|-----|
1261 tcaagaccatgggatgccaggcacccccgcgagactgccaggctccccagcgggtactgg 1320
421 S R E W M P G T P R R L P R L P Q R Y W 440

```

```

-----|-----|-----|-----|-----|
1321 cagatgcgccctctctttctggaactctctgggtaaccacgccagtgcccatatggcgtc 1380
441 Q M R P L F L E L L G N H A Q C P Y G V 460

```

hTERT Фрагмент 5 > < hTERT Фрагмент 6

```

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
1381 ctgctgaagaccactgtctctgagggccgcgctgaccagccgcccgggtgtgtgtgt 1440
461 L L K T H C P L R A A V T P A A G V C A 480

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
1441 agagaaaaaccagggctcagtggtgcacctgaagaggaggacactgacctogccgc 1500
481 R E K P Q G S V A A P E E E D T D P R R 500

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
1501 cttgtccagttgctcaggcagcattcatcaccatggcaggtgtacggcttcgtgagggt 1560
501 L V Q L L R Q H S S P W Q V Y G F V R A 520

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
1561 tgcctgcccagactggctccccccggattgtgggatctcggcacaacgaabggcgcttt 1620
521 C L R R L V P P G L W G S R H N E R R F 540

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
1621 ctgaggaatacaagaagtttatctccctgggcaagcatgcaaagctcagcttcaggag 1680
541 L R N T K K F I S L G K H A K L S L Q E 560

                                     hTERT Фрагмент 6 >
-----|-----|-----|-----|-----|-----|
1681 ctgacatggaagatgagcgttagaggatgocgatggctcaggcggtcacctggagttgga 1740
561 L T W K M S V R G C A W L R R S P G V G 580

< hTERT Фрагмент 7
-----|-----|-----|-----|-----|-----|
1741 tgcgttccagcagcagagcacaggctgcgcgaagagattctcgcaaagttcctgcaactgg 1800
581 C V P A A E H R L R E E I L A K F L H W 600

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
1801 cttatgagcgtctacgtggctegaactgctgcggtctttctctacgtgacagagaccact 1860
601 L M S V Y V V E L L R S F F Y V T E T T 620

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
1861 tttcagaagaacagactgttcttctacaggaagtcgctcggagcaagctccagagtatt 1920
621 F Q K N R L F F Y R K S V W S K L Q S I 640

                                     hTERT Фрагмент 7 > < hTERT Фрагмент 8
-----|-----|-----|-----|-----|-----|
1921 ggtattagacagcaccttaagagagttcagccttagagagctgtccgaagctgaagtcggc 1980
641 G I R Q H L K R V Q L R E L S E A E V R 660

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
1981 cagcacccggaagctcgcgcccgccctcctgacctctcggctgcggtttattccaaaacc 2040
661 Q H R E A R P A L L T S R L R F I P K P 680

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
2041 gatggccttagacctatcgtgaatatggattacgtcgtgggtgcccgcaacttcagaagg 2100
681 D G L R P I V N M D Y V V G A R T F R R 700

```

```

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
2101 gagaagcgcgcccagagagactgacatctcgcgtgaaggcacttttttctgtgcttaattat 2160
701 E K R A E R L T S R V K A L F S V L N Y 720

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
2161 gaaagagccccagacactggtcttctcggagccagcgtgctcggcctggatgatatccat 2220
721 E R A R R P G L L G A S V L G L D D I H 740

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
2221 cgggcttggcgcacactttgtgcttgggtgagggcacaggatcctcctcctgagctttat 2280
741 R A W R T F V L R V R A Q D P P P E L Y 760

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
2281 ttgtgaaagtgtgatgttactggtgcttacgatacaatccctcaggacgggctcaccgag 2340
761 F V K V D V T G A Y D T I P Q D R L T E 780

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
2341 gtgatcgcctctattatcaaacccccagaacacactactgogtgagaaggtacgcogtctt 2400
781 V I A S I I K P Q N T Y C V R R Y A V V 800
      hTERT Фрагмент 8 > < hTERT Фрагмент 9

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
2401 cagaagccgcacacagggacacgtgcgcaagcctttcaaatcccacgtgtctaccttgaca 2460
801 Q K A A H G H V R K A F K S H V S T L T 820

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
2461 gacctccagccttatatgcccagcttctgcgcacacctgcaggagactagccccttgagg 2520
821 D L Q P Y M R Q F V A H L Q E T S P L R 840

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
2521 gacgctgtggtcatcgaaacagtcacgctctctcaatgaggcatcctcaggcctgtttgat 2580
841 D A V V I E Q S S S L N E A S S G L F D 860

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
2581 gtgttctctgcgttttatgtgccaccacgccgtgcggattaggggcaagctttadgtgcag 2640
861 V F L R F M C H H A V R I R G K S Y V Q 880

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
2641 tgccagggcatcccacaggttagcctcctgagcactgctgtgtagcctgtgctatggc 2700
881 C Q G I P Q G S I L S T L L C S L C Y G 900

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
2701 gatatggagaataaattgttcgcccgtatcagaagagaeggtttgctcctgaggctgttc 2760
901 D M E N K L F A G I R R D G L L L R L F 920
      *

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
2761 ctgctggttaccocccatctgactcatgccaaaacatttttgoggactctggttaggggc 2820
921 L L V T P H L T H A K T F L R T L V R G 940

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
2821 gtgocagagtatggctgtgtgtgaatttgcggaactgtggttaatttcccagtgag 2880
941 V P E Y G C V V N L R K T V V N E P V E 960

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
2881 gacgaagctctcggaggcacagctttgttcagatgcctgccacggcctgttcccatgg 2940
961 D E A I G G T A F V Q M P A H G L F P W 980

```

```

-----|-----|-----|-----|-----|
2941 tgeggactgctgctcgatacccgaccctcgaggtgcagtcgattatagttcctatgca 3000
981 C G L L L D T R T L E V Q S D Y S S Y A 1000

hTERT Фрагмент 9 > < hTERT Фрагмент 10
-----|-----|-----|-----|-----|
3001 agaacatcaattcgggctagcctgactttcaacaggggttcaaggccggccggaatatg 3060
1001 R T S I R A S L T F N R G F K A G R N M 1020

-----|-----|-----|-----|-----|
3061 agaaggaaactgttcggagtggtgagacttaagtgtoatagtccttttttggacttgca 3120
1021 R R K L F G V L R L K C H S L F L D L Q 1040

-----|-----|-----|-----|-----|
3121 gtcaattctctccagacagtggtgtaccaacatttataaaatcctcttgctgcaggcttac 3180
1041 V N S L Q T V C T N I Y K I L L L Q A Y 1060

-----|-----|-----|-----|-----|
3181 agattccatgcctgcctgcagctgcctttccaccagcagggtgtggaaaaaccctacc 3240
1061 R F H A C V L Q L P F H Q Q V W K N P T 1080

-----|-----|-----|-----|-----|
3241 ttcttctcggggtgattagcgacaccggcagctcttggctactccatcttgaagcaaaa 3300
1081 F F L R V I S D T A S L C Y S I L K A K 1100

-----|-----|-----|-----|-----|
3301 aacgctggcatgagcttgggagctaaggggcccggctggacctctgccagtgaaagcagtc 3360
1101 N A G M S L G A K G A A G P L P S E A V 1120

-----|-----|-----|-----|-----|
3361 cagtggtgtgtcatcaggctttcctcttaaaactgacacggccaccggctgacttacgtc 3420
1121 Q W L C H Q A F L L K L T R H R V T Y V 1140

-----|-----|-----|-----|-----|
3421 ccactcctgggctccctgagaactgctcagaccagctttccgggaagcttccaggcact 3480
1141 P L L G S L R T A Q T Q L S R K L P G T 1160

hTERT
-----|-----|-----|-----|-----|
3481 acccttaccgcactcgaagcagccgccaaccctgcctgcctccgactttaagactatc 3540
1161 T L T A L E A A A N P A L P S D F K T I 1180

Фрагмент 10 >> Ter V5 Ter V5 >
-----|-----|-----|-----|-----|
3541 ctggacggcaagccaattcctaataccattgctgggctggactcaacttga 3591
1181 I D G K P I P N P L L G L D S T P 1196

```

Фиг. 27


```

-----|-----|-----|-----|-----|
601 ttcgtgctgggtggctccctcctgcgcataaccaggctctgcggacccccact 650
201 F V L V A P S C A Y Q V C G P P L 217

```

hTERT Фрагмент 2 <> G-линкер <> **hTERT**

```

-----|-----|-----|-----|-----|
651 ttatcagctcggcgctgctGGTGGAGGTGGTGGAGGTgccgggtgtgtgtg 700
218 Y Q L G A A G G G G G G A G V C A 234

```

Фрагмент 6

```

-----|-----|-----|-----|-----|
701 ctagagaaaaaccccagggtcagtggtgcacctgaagaggaggacact 750
235 R E K P Q G S V A A P E E E D T 250

```

```

-----|-----|-----|-----|-----|
751 gaccctcgcgccttgtccagttgctcaggcagcattcatcaccatggca 800
251 D P R R L V Q L L R Q H S S P W Q 267

```

```

-----|-----|-----|-----|-----|
801 ggtgtacggcttcgtgagggttgctgcggagactgggtccccccggat 850
268 V Y G F V R A C L R R L V P P G L 284

```

```

-----|-----|-----|-----|-----|
851 tgtgggatctcggcacacaacggcgctttctgaggaatacaaaagaag 900
285 W G S R H N E R R F L R N T K K 300

```

```

-----|-----|-----|-----|-----|
901 tttatctccctgggcaagcatgcaaagctcagcttgccaggagctgacatg 950
301 F I S L G K H A K L S L Q E L T W 317

```

hTERT Фрагмент 6 <>

```

-----|-----|-----|-----|-----|
951 gaagatgagcgttagaggaatggcgcacatggctcaggcggtaacctggagtG 1000
318 K M S V R G C A W L R R S P G V G 334

```

G-линкер <> **hTERT** Фрагмент 4

```

-----|-----|-----|-----|-----|
1001 GAGGTGGAGGTGGAGGAtcctgggctcaccocggaaggaccaggggccca 1050
335 G G G G G S W A H P G R T R G P 350

```

```

-----|-----|-----|-----|-----|
1051 agcgataggggcttctgtgtgtgtcaccagccaggcctgcccgaagaggg 1100
351 S D R G F C V V S P A R P A E E A 367

```

hTERT Фрагмент 4 <> G-линкер

```

-----|-----|-----|-----|-----|
1101 tacctccttggaaggagccctcagtgccaccaggGGTGGTGGAGGTGGAG 1150
368 T S L E G A L S G T R G G G G G G 384

```

<> **hTERT** Фрагмент 9

```

-----|-----|-----|-----|-----|
1151 GAaaaatcccacgtgtctaccttgacagacctccagccttatatgcccag 1200
385 K S H V S T L T D L Q P Y M R Q 400

```

```

-----|-----|-----|-----|-----|
1201 ttgtgcacacctgcaggagactagcccttgagggacgctgtggtcat 1250
401 F V A H L Q E T S P L R D A V V I 417

-----|-----|-----|-----|-----|
1251 cgaacagtcacagctctctcaatgaggcatcctcaggcctgtttgatgtgt 1300
418 E Q S S S L N E A S S G L F D V F 434

-----|-----|-----|-----|-----|
1301 tctgcgctttatgtgccaccacgccgtgctggattaggggcaagtcttac 1350
435 L R F M C H H A V R I R G K S Y 450

-----|-----|-----|-----|-----|
1351 gtgcagtgccagggcatcccacagggtagcatcctgagcacactgctgtg 1400
451 V Q C Q G I P Q G S I L S T L L C 467

-----|-----|-----|-----|-----|
1401 tagcctgtgctatggcgatatggagaataaattgttcgccggtatcagaa 1450
468 S L C Y G D M E N K L F A G I R R 484

-----|-----|-----|-----|-----|
1451 gagacggtttgctcctgaggctgttcctgctggttaccocccatctgact 1500
485 D G L L L R L F L L V T P H L T 500
*

-----|-----|-----|-----|-----|
1501 catgcaaaaacatttttgoggactctggttagggcgctgcoagagtatgg 1550
501 H A K T F L R T L V R G V P E Y G 517

-----|-----|-----|-----|-----|
1551 ctgtgttggaatttgccgaaaactgtggttaatttcccagtgaggagcg 1600
518 C V V N L R K T V V N F P V E D E 534

-----|-----|-----|-----|-----|
1601 aagctctcggaggcacagcttttgctcagatgcctgccaccggcctgttc 1650
535 A L G G T A F V Q M P A H G L F 550

-----|-----|-----|-----|-----|
1651 ccattgctcggactgctgctcgataccggaccctcgagggtgcagtcoga 1700
551 P W C G L L L D T R T L E V Q S D 567
hTERT Фрагмент 9 <> G-лиinker <> hTERT
-----|-----|-----|-----|-----|
1701 ttatagttcctatgcaagaacatcaattGGAGGAGGTGGTGGAGGTtggg 1750
568 Y S S Y A R T S I G G G G G W N 584
Фрагмент 3
-----|-----|-----|-----|-----|
1751 atcatagcgtgcgggaggcagggtgtgcctctcggcctgccagcccccgga 1800
585 H S V R E A G V P L G L P A P G 600

-----|-----|-----|-----|-----|
1801 gcaaggagacgctgggatccgccagtcgctcactccccttgccctaagag 1850
601 A R R R G G S A S R S L P L P K R 617

```

```

hTERT          3 <<                >> hTERT          1
-----|-----|-----|-----|-----|
1851 gccaagaagaggagccGGTGGAGGAGGTGGTGGActggccaccttcgtgc 1900
618 P R R G A G G G G G G L A T F V R 634

-----|-----|-----|-----|-----|
1901 ggcgccctgggaccccagggctggcggtggtgcagcgcggggaccctgct 1950
635 R L G P Q G W R L V Q R G D P A 650

-----|-----|-----|-----|-----|
1951 gctttcagagctctctgctcgcccagtgctctggtctgctgcttccttgggacgc 2000
651 A F R A L V A Q C L V C V P W D A 667

-----|-----|-----|-----|-----|
2001 acggccccccacccgcgcgcccccagtttccggcaggtgagttgtctcaaaag 2050
668 R P P P A A P S F R Q V S C L K E 684

-----|-----|-----|-----|-----|
2051 agttgggtgctcgggtgttgcagcggtttgtgaaaggggagcaagaac 2100
685 L V A R V L Q R L C E R G A K N 700

hTERT Фрагмент 1 << G-линкер
-----|-----|-----|-----|-----|
2101 gtccttgctcttggcttcgcttgcctgatggagcacgcggaGGAGGTGG 2150
701 V L A F G F A L L D G A R G G G G 717

<< hTERT Фрагмент 8
-----|-----|-----|-----|-----|
2151 TGGAGGTGGAagagagctgtccgaagctgaagtcogccagcaccgcgaag 2200
718 G G G R E L S E A E V R Q H R E A 734

-----|-----|-----|-----|-----|
2201 ctgccccgcctcctgacctctcggtcgggtttattcccaaacccgat 2250
735 R P A L L T S R L R F I P K P D 750

-----|-----|-----|-----|-----|
2251 ggcccttagacctatcgtgaatatggattacgtcgtgggtgcccgacttt 2300
751 G L R P I V N M D Y V V G A R T F 767

-----|-----|-----|-----|-----|
2301 cagaagggagaagcgcgcccagagactgacatctcgcgtgaaggcacttt 2350
768 R R E K R A E R L T S R V K A L F 784

-----|-----|-----|-----|-----|
2351 tttctgtgcttaattatgaaagagcccgcagacctggtcttctcggagcc 2400
785 S V L N Y E R A R R P G L L G A 800

-----|-----|-----|-----|-----|
2401 agcgtgctcggcctggatgatatccatcgggcttggcgcacctttgtgct 2450
801 S V L G L D D I H R A W R T F V L 817

```

-----|-----|-----|-----|-----|
 2451 tgggtgagggcacaggatcctcctcctgagctttatTTTTgtgaaagttg 2500
 818 R V R A Q D P P P E L Y F V K V D 834

-----|-----|-----|-----|-----|
 2501 atgttactgggtgcttacgatatacaatccctcaggaccgggtcaccgaggtg 2550
 835 V T G A Y D T I P Q D R L T E V 850

-----|-----|-----|-----|-----|
 2551 atcgcctctattatcaaacccccagaacacctactgcgtgagaaggtacgc 2600
 851 I A S I I K P Q N T Y C V R R Y A 867

hTERT Фрагмент 8 >> G-линкер

-----|-----|-----|-----|-----|
 2601 cgtcgttcagaaaagccgcacacgggacacgtgcgc^{aaa}GGTGGAGGAGGTG 2650
 868 V V Q K A A H G H V R K G G G G G 884

>> hTERT Фрагмент 10

-----|-----|-----|-----|-----|
 2651 GTGGA^{aac}aggggcttcaaggccggccggaatatgagaaggaactgttc 2700
 885 G N R G F K A G R N M R R K L F 900

-----|-----|-----|-----|-----|
 2701 ggagtggtgagacttaagtgtcatagtctTTTTTggacttgcaggtcaa 2750
 901 G V L R L K C H S L F L D L Q V N 917

-----|-----|-----|-----|-----|
 2751 ttctctccagacagtgtgtaccaacatttataaaaatcctcttgcgtgcagg 2800
 918 S L Q T V C T N I Y K I L L L Q A 934

-----|-----|-----|-----|-----|
 2801 dttacagattccatgcctgcgtcctgcagctgcctttccaccagcaggtg 2850
 935 Y R F H A C V L Q L P F H Q Q V 950

-----|-----|-----|-----|-----|
 2851 tggaaaaaccctaccttcttctcctgcgggtgattagcgcacccgccagtct 2900
 951 W K N P T F F L R V I S D T A S L 967

-----|-----|-----|-----|-----|
 2901 ttgctactccatcttgaaagcaaaaaacgctggcatgagcttgggagcta 2950
 968 C Y S I L K A K N A G M S L G A K 984

-----|-----|-----|-----|-----|
 2951 agggcgcgctggacctctgccagtgaaagcagtcaccagtggtgtgtcat 3000
 985 G A A G P L P S E A V Q W L C H 1000

-----|-----|-----|-----|-----|
 3001 caggcttctcctccttaaacctgacacgccaccgctgacttacgtcccact 3050
 1001 Q A F L L K L T R H R V T Y V P L 1017

-----|-----|-----|-----|-----|
 3051 cctgggtccctgagaactgctcagaccagctttcccgaaacttccag 3100
 1018 L G S L R T A Q T Q L S R K L P G 1034

```

-----|-----|-----|-----|
3101 gcactaccottaccgcactcgaagcagccgccaaccctgccctgccctcc 3150
1035 T T L T A L E A A A N P A L P S 1050

```

hTERT Фрагмент 10 >< G-лиinker >< hTERT

```

-----|-----|-----|-----|
3151 gactttaagactatcctggaGGAGGTGGAGGTGGAGGTccctgccacc 3200
1051 D F K T I L D G G G G G G P C P P 1067

```

Фрагмент 5

```

-----|-----|-----|-----|
3201 agtgtatgcogagaccaagcactttttgtattccagtggcgataaagagc 3250
1068 V Y A E T K H F L Y S S G D K E Q 1084

```

```

-----|-----|-----|-----|
3251 agtcocggccctcttttctgtctcaagcctccgccctctctgaccgga 3300
1085 L R P S F L L S S L R P S L T G 1100

```

```

-----|-----|-----|-----|
3301 gctcgcaggctggggagaccatctttctgggctcaagaccatggatgcc 3350
1101 A R R L V E T I F L G S R P W M P 1117

```

```

-----|-----|-----|-----|
3351 aggcacccccgcagactgccaggctccccagcggactggcagatgc 3400
1118 G T P R R L P R L P Q R Y W Q M R 1134

```

```

-----|-----|-----|-----|
3401 gccctctctttctggaacttctgggtaaccacgccagtgcccatatggc 3450
1135 P L F L E L L G N H A Q C P Y G 1150

```

hTERT Фрагмент 5 >< G-лиinker

```

-----|-----|-----|-----|
3451 gtcctgctgaagaccactgtcctctgagggccgcctgaccGGAGGTGG 3500
1151 V L L K T H C P L R A A V T G G G 1167

```

>< Ter V5

```

-----|-----|-----|-----|
3501 TGGAGGAGGTggcaagccaattcctaattccattgctgggcctggactcaa 3550
1168 G G G G K P I P N P L L G L D S T 1184

```

Ter V5 ><

```

-----
3551 cttga 3555
    □

```

Фиг. 28

< Убиквитин человека

```

-----|-----|-----|-----|-----|
1 atgcagattttcgtcaaaacattgacaggaaagaccatcacactggaagt 50
1 M Q I F V K T L T G K T I T L E V 17

-----|-----|-----|-----|-----|
51 ggagccaagcgacactattgagaacgtcaaaagccaagattcaggacaagg 100
18 E P S D T I E N V K A K I Q D K E 34

-----|-----|-----|-----|-----|
101 agggcatcccaccagaccagcagaggctgatttttgcggaaagcagctg 150
35 G I P P D Q Q R L I F A G K Q L 50

-----|-----|-----|-----|-----|
151 gaggacggacgcacactcagtgactacaatatccagaaggaaagtactct 200
51 E D G R T L S D Y N I Q K E S T L 67

```

Убиквитин человека >< G-линкер >< hTERT

```

-----|-----|-----|-----|-----|
201 gcattctggtccttcgctgcgcggcggaGGTGGAGGTGGAaacaggggct 250
68 H L V L R L R G G G G G G N R G F 84

```

Фрагмент 10

```

-----|-----|-----|-----|-----|
251 tcaaggccggccggaatatgagaaggaaactgttcggagtgttgagactt 300
85 K A G R N M R R K L F G V L R L 100

-----|-----|-----|-----|-----|
301 aagtgtcatagtcttttttggacttgcagggtcaattctctccagacagt 350
101 K C H S L F L D L Q V N S L Q T V 117

-----|-----|-----|-----|-----|
351 gtgtaccaaacatttataaaaatcctcttgcctgcagggttacagattccatg 400
118 C T N I Y K I L L L Q A Y R F H A 134

-----|-----|-----|-----|-----|
401 cctgcgtcctgcagctgcctttccaccagcagggtgtggaaaaaccctacc 450
135 C V L Q L P F H Q Q V W K N P T 150

-----|-----|-----|-----|-----|
451 ttcttctgcgggtgattagcgacaccgccagctctttgctactccatctt 500
151 F F L R V I S D T A S L C Y S I L 167

-----|-----|-----|-----|-----|
501 gaaagcaaaaaacgctggcatgagcttgggagctaaggcgccgctggac 550
168 K A K N A G M S L G A K G A A G P 184

-----|-----|-----|-----|-----|
551 ctctgccagtgaaagcagtcacagtggtgtgtcatcagctttcctctt 600
185 L P S E A V Q W L C H Q A F L L 200

```

```

-----|-----|-----|-----|-----|
601 aaactgacacgcccaccgctgacttacgtcccactcctgggctccctgag 650
201 K L T R H R V T Y V P L L G S L R 217

-----|-----|-----|-----|-----|
651 aactgctcagaccagctttcccggaacttccaggcactacccttaccg 700
218 T A Q T Q L S R K L P G T T L T A 234
hTERT

-----|-----|-----|-----|-----|
701 cactcgaagcagcccgccaaccctgccctgccctccgactttaagactatc 750
235 L E A A A N P A L P S D F K T I 250

```

Фрагмент 10 >< G-линкер >< **hTERT** Фрагмент 9

```

-----|-----|-----|-----|-----|
751 ctgggacGGAGGTGGTGGAGGTGGAaaatcccacgtgtctaccttgacaga 800
251 L D G G G G G G K S H V S T L T D 267

-----|-----|-----|-----|-----|
801 cctccagccttatatgcccagctttgtcgcacacctgcaggagactagcc 850
268 L Q P Y M R Q F V A H L Q E T S P 284

-----|-----|-----|-----|-----|
851 ccttgagggacgctgtggtcctcgaacagtcacgctctctcaatgaggca 900
285 L R D A V V I E Q S S S L N E A 300

-----|-----|-----|-----|-----|
901 tctcaggcctgctttgatgtgttcctcgcctttatgtgcaccacgctgt 950
301 S S G L F D V F L R F M C H H A V 317

-----|-----|-----|-----|-----|
951 ggggattaggggcaagtcttacgtgcagtgccagggcatcccacagggta 1000
318 R I R G K S Y V Q C Q G I P Q G S 334

-----|-----|-----|-----|-----|
1001 gcatcctgagcacactgctgtgtgtagcctgtgctatggcgatatggagaat 1050
335 I L S T L L C S L C Y G D M E N 350

-----|-----|-----|-----|-----|
1051 aaattgctcgggtatcagaagagacggcttgctcctgaggctgttccct 1100
351 K L F A G I R R D G L L L R L F L 367
*

-----|-----|-----|-----|-----|
1101 gctggttacccccatctgactcatgccaaaacatTTTTgCGGactctgg 1150
368 L V T P H L T H A K T F L R T L V 384

-----|-----|-----|-----|-----|
1151 ttaggggcgtgccagagtatggctgtgttggaatttgCGGaaaactgtg 1200
385 R G V P E Y G C V V N L R K T V 400

-----|-----|-----|-----|-----|
1201 gttaatTTCCagtgaggacgaagctctcggaggcacagctTTTgttca 1250
401 V N F P V E D E A L G G T A F V Q 417

```

```

-----|-----|-----|-----|-----|
1251 gatgcctgcccacggcctgttcccattggtgoggactgctgctcgataccc 1300
418 M P A H G L F P W C G L L L D T R 434
                                hTERT Фрагмент 9 >
-----|-----|-----|-----|-----|
1301 ggaccctcgagggtgcagtcocgattatagttcctatgcaagaacatcaatt 1350
435 T L E V Q S D Y S S Y A R T S I 450
< G-линкер > hTERT Фрагмент 8
-----|-----|-----|-----|-----|
1351 GGTGGAGGTGGTGGAGGTagagagctgtccgaagctgaagtcggccagca 1400
451 G G G G G R E L S E A E V R Q H 467
-----|-----|-----|-----|-----|
1401 ccgcaagctcgccccgcctcctgacctctcggctcgggtttattccca 1450
468 R E A R P A L L T S R L R F I P K 484
-----|-----|-----|-----|-----|
1451 aaccgatggccttagacctatcgtgaatatggattacgctcgtgggtgcc 1500
485 P D G L R P I V N M D Y V V G A 500
-----|-----|-----|-----|-----|
1501 cgcactttcagaagggagaagcgcgcccagagagactgacatctcggctgaa 1550
501 R T F R R E K R A E R L T S R V K 517
-----|-----|-----|-----|-----|
1551 ggcactttttctgtgcttaattatgaaagagcccgcagacctggtcttc 1600
518 A L F S V L N Y E R A R R P G L L 534
-----|-----|-----|-----|-----|
1601 tcggagccagcgtgctcggcctggatgatatccatcgggcttggcgcacc 1650
535 G A S V L G L D D I H R A W R T 550
-----|-----|-----|-----|-----|
1651 tttgtgcttcgggtgagggcacaggatcctcctcctgagctttatttgt 1700
551 F V L R V R A Q D P P P E L Y F V 567
-----|-----|-----|-----|-----|
1701 gaaagttgatgttactggtgcttacgatacaaatccctcaggaccggctca 1750
568 K V D V T G A Y D T I P Q D R L T 584
-----|-----|-----|-----|-----|
1751 ccgagggtgatgcctctattatcaaaccocagaacacctactgctgagaga 1800
585 E V I A S I I K P Q N T Y C V R 600
                                hTERT Фрагмент 8 >< G
-----|-----|-----|-----|-----|
1801 aggtacgcccgtcgttcagaaagccgcacacggacacgtgcgcaaaGGAGG 1850
601 R Y A V V Q K A A H G H V R K G G 617
                                линкер >< hTERT Фрагмент 7
-----|-----|-----|-----|-----|
1851 TGGAGGTGGAGGAtgcgcttcacagcagcagagcacaggctgogcgaagaga 1900
618 G G G G C V P A A E H R L R E E I 634

```

```

-----|-----|-----|-----|-----|
1901 ttctcgcaaagtctctgcactggccttatgagcgtctacgtggctgcaactg 1950
635 L A K F L H W L M S V Y V V E L 650

```

```

-----|-----|-----|-----|-----|
1951 ctgcggtctttcttctacgtgacagagaccacttttcagaagaacagact 2000
651 L R S F F Y V T E T T F Q K N R L 667

```

```

-----|-----|-----|-----|-----|
2001 gttcttctacaggaagtcctgctggagcaagctccagagtattgggatta 2050
668 F F Y R K S V W S K L Q S I G I R 684

```

hTERT Фрагмент 7 >< G-линкер >< **hTERT**

```

-----|-----|-----|-----|-----|
2051 gacagcaccttaagagagttcagGGTGGTGGAGGTGGAGGAgccgggtgtg 2100
685 Q H L K R V Q G G G G G G A G V 700

```

Фрагмент 6

```

-----|-----|-----|-----|-----|
2101 tgtgctagagaaaaaccocagggtcagtggtgcacctgaagaggagga 2150
701 C A R E K P Q G S V A A P E E E D 717

```

```

-----|-----|-----|-----|-----|
2151 cactgaccctcgccgcttgcctcagttgctcagggcagcattcatcaccat 2200
718 T D P R R L V Q L L R Q H S S P W 734

```

```

-----|-----|-----|-----|-----|
2201 ggcaggtgtacggcttcgtgagggcttgctcctgaggagactgggtcccccc 2250
735 Q V Y G F V R A C L R R L V P P 750

```

```

-----|-----|-----|-----|-----|
2251 ggattgtgggatctcggcacaacgaacggcgtttctgaggaatacaaaa 2300
751 G L W G S R H N E R R F L R N T K 767

```

```

-----|-----|-----|-----|-----|
2301 gaagtttatctccctgggcaagcatgcaagctcagcttgaggagctga 2350
768 K F I S L G K H A K L S L Q E L T 784

```

hTERT

```

-----|-----|-----|-----|-----|
2351 catggaagatgagcgttagaggatgcatggctcaggcgggtcacctgga 2400
785 W K M S V R G C A W L R R S P G 800

```

Фрагмент 6 >< G-линкер >< **hTERT** Фрагмент 5

```

-----|-----|-----|-----|-----|
2401 gttGGAGGAGGTGGTGGAGGTcccgtgccaccagtgatgcccagaccaa 2450
801 V G G G G G G P C P P V Y A E T K 817

```

```

-----|-----|-----|-----|-----|
2451 gcactttttgtattccagtgccgataaagagcagctccggccctcttttc 2500
818 H F L Y S S G D K E Q L R P S F L 834

```

-----|-----|-----|-----|-----|
 2501 tgetotcaagcctccgccccctctctgaccggagctcgcaggetgggtggag 2550
 835 L S S L R P S L T G A R R L V E 850

-----|-----|-----|-----|-----|
 2551 accatctttctgggctcaagaccatgggatgccagggcaccocccgcagact 2600
 851 T I F L G S R P W M P G T P R R L 867

-----|-----|-----|-----|-----|
 2601 gccacaggctccccagcggtaactggcagatgcgccctctctttctggaac 2650
 868 P R L P Q R Y W Q M R P L F L E L 884

-----|-----|-----|-----|-----|
 2651 ttctgggtaaccacgcccagtgcccatatggcgtcctgctgaagaccac 2700
 885 L G N H A Q C P Y G V L L K T H 900

hTERT Фрагмент 5 >< G-линкер >< hTERT

-----|-----|-----|-----|-----|
 2701 tgtcctctgagggccgcggtgaccGGTGGAGGAGGTGGTGGAttctgggc 2750
 901 C P L R A A V T G G G G G G S W A 917

Фрагмент 4

-----|-----|-----|-----|-----|
 2751 tcaccccggaagaccaggggccccagcagatagggccttctgtgtgtgt 2800
 918 H P G R T R G P S D R G F C V V S 934

-----|-----|-----|-----|-----|
 2801 caccagccagcctgccgaagaggtacctccttgggaaggagccctcagt 2850
 935 P A R P A E E A T S L E G A L S 950

hTERT Фрагмент 4 >< G-линкер >< hTERT Фрагмент 3

-----|-----|-----|-----|-----|
 2851 ggcaccaggGGAGGTGGTGGAGGTGGAttggaatcatagcgtgcgggaggc 2900
 951 G T R G G G G G W N H S V R E A 967

-----|-----|-----|-----|-----|
 2901 aggtgtgcctctcggcctgccagcccccggagcaaggagacgcggtggat 2950
 968 G V P L G L P A P G A R R R G G S 984

hTERT Фрагмент 3 ><

-----|-----|-----|-----|-----|
 2951 ccgcagtcgctcactcccccttgcctaagaggccaagaagaggagccGGT 3000
 985 A S R S L P L P K R P R R G A G 1000

G-линкер >< hTERT Фрагмент 2

-----|-----|-----|-----|-----|
 3001 GGAGGAGGTGGTGGAttcactactagcgtccggtcctacctgcccacac 3050
 1001 G G G G G F T T S V R S Y L P N T 1017

-----|-----|-----|-----|-----|
 3051 agtgaccgacgctctgagaggttcagggtgcctggggtctgctgctgcgga 3100
 1018 V T D A L R G S G A W G L L L R R 1034

```

-----|-----|-----|-----|-----|
3101 gggtagggatgatgatttctggttcacctcctggcccgggtgtgcccctgttc 3150
1035 V G D D V L V H L L A R C A L F 1050

-----|-----|-----|-----|-----|
3151 gtgctgggtggctcccctcctggcgcataaccaggtctgaggacccccacttta 3200
1051 V L V A P S C A Y Q V C G P P L Y 1067

hTERT Фрагмент 2 <> G-линкер <> hTERT Фрагмент 1
-----|-----|-----|-----|-----|
3201 tcagctcggcgctgctGGAGGTGGAGGTGGAGGTctggccacccttcgtgc 3250
1068 Q L G A A G G G G G G L A T F V R 1084

-----|-----|-----|-----|-----|
3251 ggcgcctgggaccccagggtggcggtggtgcagcgggggaccctgct 3300
1085 R L G P Q G W R L V Q R G D P A 1100

-----|-----|-----|-----|-----|
3301 gctttcagagctctcgtcgcaccagtgctcgtggtctgccttccctgggagc 3350
1101 A F R A L V A Q C L V C V P W D A 1117

-----|-----|-----|-----|-----|
3351 acggccccaccgcgcgccccagtttccggcagggtgagttgtctcaaag 3400
1118 R P P P A A P S F R Q V S C L K E 1134

-----|-----|-----|-----|-----|
3401 agttggttgcctcgggtggtgcagcggctttgtgaaagggagcaagaac 3450
1135 L V A R V L Q R L C E R G A K N 1150

hTERT Фрагмент 1 <> G
-----|-----|-----|-----|-----|
3451 gtccttgcctttggcttcgctttgctcgatggagcaagcgggAGGAGGTGG 3500
1151 V L A F G F A L L D G A R G G G G 1167

линкер <> Ter V5
-----|-----|-----|-----|-----|
3501 TGGAGGAGGTggcaagccaattcctaattcattgctgggcctggactcaa 3550
1168 G G G G K P I P N P L L G L D S T 1184

Ter V5 <>
-----
3551 cttga 3555
□

```

Фиг. 29

