



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.11.21

(21) Номер заявки
201892003

(22) Дата подачи заявки
2017.04.26

(51) Int. Cl. **A61K 39/12** (2006.01)
A61K 39/35 (2006.01)
C07K 14/005 (2006.01)
C07K 14/08 (2006.01)
C07K 16/24 (2006.01)

(54) ЛЕЧЕНИЕ АТОПИЧЕСКОГО ДЕРМАТИТА СОБАК

(31) **16167264.7**

(32) **2016.04.27**

(33) **EP**

(43) **2019.05.31**

(86) **PCT/EP2017/059977**

(87) **WO 2017/186813 2017.11.02**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ЭЛАНКО ЮЭс, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Тарс Каспарс (LV)

(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(56) ØYSTEIN GRIMSTAD ET AL.: "Anti-interleukin-31-antibodies ameliorate scratching behaviour in NC/Nga mice: a model of atopic dermatitis", EXPERIMENTAL DERMATOLOGY, vol. 18, no. 1, 1 January 2009 (2009-01-01), pages 35-43, XP055001458, ISSN: 0906-6705, DOI: 10.1111/j.1600-0625.2008.00766.x, abstract, page 42, left-hand column, last paragraph

K.E. LEWIS ET AL.: "Interleukin (IL) 31 induces in cynomolgus monkeys a rapid and intense itch response that can be inhibited by an IL-31 neutralizing antibody", JEADV. JOURNAL OF THE EUROPEAN ACADEMY OF DERMATOLOGY AND VENEREOLOGY, vol. 31, no. 1, 8 January 2017 (2017-01-08), pages 142-150, XP055389924, NL, ISSN: 0926-9959, DOI: 10.1111/jdv.13794, abstract

AKOS GELLÉRT ET AL.: "A Cucumber Mosaic Virus Based Expression System for the Production of Porcine Circovirus Specific Vaccines", PLOS ONE, vol. 7, no. 12, 20 December 2012 (2012-12-20), page e52688, XP055221371, DOI: 10.1371/journal.pone.0052688, abstract

KHAIRUNADWA JEMON ET AL.: "An Enhanced Heterologous Virus-Like Particle for Human Papillomavirus Type 16 Tumour Immunotherapy", PLOS ONE, vol. 8, no.

6, 14 June 2013 (2013-06-14), page e66866, XP055221454, DOI: 10.1371/journal.pone.0066866, abstract

WO-A1-2006032674

KAUMAYA P T P ET AL.: "PEPTIDE VACCINES INCORPORATING A 'PROMISCUOUS' T-CELL EPITOPE BYPASS CERTAIN HAPLOTYPE RESTRICTED IMMUNE RESPONSES AND PROVIDE BROAD SPECTRUM IMMUNOGENICITY", JOURNAL OF MOLECULAR RECOGNITION, HEYDEN & SON LTD., LONDON, GB, vol. 6, 1 January 1993 (1993-01-01), pages 81-94, XP000939315, ISSN: 0952-3499, DOI: 10.1002/JMR.300060206, abstract

WO-A1-2016062720

K KASUTANI ET AL.: "Anti-IL-31 receptor antibody is shown to be a potential therapeutic option for treating itch and dermatitis in mice", BRITISH JOURNAL OF PHARMACOLOGY, 5 September 2014 (2014-09-05), pages n/a-n/a, XP055141286, ISSN: 0007-1188, DOI: 10.1111/bph.12823, abstract

ALAIN C. TISSOT ET AL.: "Versatile Virus-Like Particle Carrier for Epitope Based Vaccines", PLOS ONE, vol. 5, no. 3, 23 March 2010 (2010-03-23), page e9809, XP055155235, DOI: 10.1371/journal.pone.0009809, The whole document, in particular Figure 1 and Table 1

ANDREA J. GONZALES ET AL.: "Interleukin-31: its role in canine pruritus and naturally occurring canine atopic dermatitis", VETERINARY DERMATOLOGY, vol. 24, no. 1, 19 February 2013 (2013-02-19), pages 48-e12, XP055284818, GB ISSN: 0959-4493, DOI: 10.1111/j.1365-3164.2012.01098.x

DATABASE UniProt [Online], 1 March 2001 (2001-03-01), "SubName: Full=Capsid protein {ECO:0000313|EMBL:ABY27309.1}; SubName: Full=Coat protein {ECO:0000313|EMBL:CAC18657.1};", XP002759444, retrieved from EBI accession no. UNIPROT:Q9DJX6, Database accession no. Q9DJX6 sequence & HANNA BERNIAK ET AL.: "Cucumber mosaic virus groups IA and II are represented among isolates from naturally infected lilies", EUROPEAN JOURNAL OF PLANT PATHOLOGY, KLUWER ACADEMIC PUBLISHERS, DO, vol. 127, no. 3, 14 March 2010 (2010-03-14), pages 305-309, XP019817308, ISSN: 1573-8469

(57) Изобретение относится к композициям, иммуногенным или вакцинным композициям и фармацевтическим композициям для профилактики или лечения атопического дерматита собак (АДС). Кроме того, в настоящем изобретении предложены способы профилактики или лечения АДС. Композиции согласно настоящему изобретению вызывают эффективный иммунный ответ, в частности гуморальный ответ, у собак и, таким образом, являются подходящими для лечения и/или профилактики АДС.

Настоящее изобретение относится к композициям, иммуногенным или вакцинным композициям и фармацевтическим композициям для профилактики или лечения атопического дерматита собак (АДС). Кроме того, в настоящем изобретении предложены способы профилактики или лечения АДС. Композиции согласно настоящему изобретению вызывают эффективный иммунный ответ, в частности гуморальный ответ, у собак и, таким образом, являются подходящими для лечения и/или профилактики АДС.

Предшествующий уровень техники

Атопический дерматит собак (АДС) по определению представляет собой воспалительное и зудящее аллергическое заболевание кожи, вызываемое взаимодействием генетических факторов и факторов окружающей среды и поражающее до 10% всех собак (Hensel P et al., (2015) BMC Veterinary Research 11:196-209; Meury S et al., (2011) Vet Dermatol 22: 327-334; Nodtvedt A, et al., (2007) Prev Vet Med 78: 210-222). Это второе по распространенности аллергическое заболевание кожи у представителей семейства псовых, в частности, домашних собак, уступающее только аллергии на блох. Аллергические симптомы проявляются как экзематозное поражение кожи; кроме того, представители семейства псовых, например, домашние собаки с атопическим дерматитом часто страдают от прурита, или сильного зуда, выпадения шерсти, царапин из-за глубокого расчесывания, часто лижут лапы и продуцируют избыточное количество слезной жидкости. Кроме того, часто встречаются вторичные проблемы с кожей, в том числе кожные инфекции и избыточное выделение кожного сала.

Клинические признаки обычно развиваются в молодом возрасте; пиковый возраст их проявления обычно составляет от шести месяцев до трех лет. Морда, уши, лапы, конечности, брюхо и сгибаемые поверхности обычно поражаются зудом и эритемой (Griffin CE, DeBoer DJ (2001) Veterinary Immunology and Immunopathology 81: 255-269). Это заболевание в типичном случае представляет собой хроническое рецидивирующее состояние, и большинство собак нуждаются в продолжительной, обычно пожизненной терапии (Nuttall T., et al., Veterinary Record (2014) 174 (suppl 2), 3-12).

К настоящему времени описано несколько средств лечения АДС и зуда, в том числе применение антигистаминных средств, например, фексофенадина, или таких лекарственных средств, как циклоспорин. Кроме того, для лечения АДС имеется недавно зарегистрированный продукт, известный как ингибитор янус-киназы, или JAK (Nuttall T., et al., Veterinary Record (2014) 174 (suppl 2), 3-12); WO 2015/042596).

Хотя эти лекарственные средства, по-видимому, эффективны, у них есть существенные побочные эффекты, которые могут препятствовать их долгосрочному применению. Например, эти лекарственные средства подавляют иммунную систему представителей семейства псовых, например, домашних собак, что может привести к развитию инфекций. Кортикостероиды также могут вызывать остеопороз, проблемы с эндокринной системой и катаракту у представителей семейства псовых и домашних собак. Кроме того, у кортикостероидов есть тенденция к стимуляции частого приема пищи, жидкости и мочеиспускания у представителей семейства псовых, например, домашних собак, что владельцы собак считают нежелательным. Более того, многие из этих лекарственных средств необходимо вводить перорально и ежедневно, что делает их применение очень неудобным. Поскольку АДС часто представляет собой хроническое состояние, эти проблемы с безопасностью и побочные эффекты обуславливают значительную неудовлетворенную потребность в безопасном и эффективном средстве для долгосрочного лечения. Кроме того, дополнительным вопросом, вызывающим интерес, является не только безопасность, но и удобство применения. Таким образом, остается потребность в вариантах лечения АДС. Настоящее изобретение удовлетворяет эту потребность.

Краткое описание изобретения

В настоящем изобретении предложены композиции для профилактики и лечения атопического дерматита у представителей семейства псовых, в том числе, предпочтительно, домашних собак (*Canis lupus familiaris* или *Canis familiaris*) и других членов данного семейства. В частности, в настоящем изобретении предложены композиции и их применение для профилактики и лечения атопического дерматита собак (АДС), причем предпочтительные композиции согласно настоящему изобретению содержат антиген собачьего интерлейкина-31 (антиген cIL-31), экспонированный на вирусоподобных частицах вируса растения (вируса мозаики огурца, CMV), модифицированных путем встраивания эпитопов Th-клеток, в частности, универсальных эпитопов Th-клеток. Кроме того, эти модифицированные VLP используются в качестве вакцин для индукции иммунного ответа, в частности, гуморального ответа против cIL-31. Присутствие эпитопов Th-клеток, в частности, универсальных эпитопов Th-клеток, приводит к дальнейшему усилению вызванного иммунного ответа и, таким образом, благоприятному эффекту с точки зрения профилактики и лечения АДС.

Таким образом, введение композиций согласно настоящему изобретению представителям семейства псовых, в частности, домашним собакам, приводит к эффективному ослаблению параметров и симптомов заболевания АДС. В частности, введение композиций согласно настоящему изобретению представителям семейства псовых, в частности, домашним собакам, не только приводит к индукции аутоантител и снижению уровня собачьего интерлейкина-31 в крови и коже представителей семейства псовых, в частности, домашних собак, но указанное снижение уровня cIL-31 коррелирует со снижением симптомов заболевания АДС. Кроме того, введение композиций согласно настоящему изобретению представи-

телям семейства псовых, в частности, домашним собакам, приводит к ослаблению зуда и эффективному снижению степени тяжести поражений кожи у собак с АДС.

Лечение в соответствии с настоящим изобретением приводит к снижению показателя поражений при атопическом дерматите или ADLI и визуальному аналоговому балльному показателю зуда или PVAS у представителей семейства псовых, которых лечат, в частности, домашних собак. Показатель ADLI представляет собой проверенный объединенный показатель шести клинических симптомов, ассоциированных с атопическим дерматитом собак и оцениваемых по пяти указанным частям тела. Эксперт выполняет балльную оценку каждого параметра в каждой указанной части тела по шкале от нуля до пяти, причем оценка "нуль" означает отсутствие очагов, а оценка "пять" - тяжелые/обширные очаги. Эксперт выполняет балльную оценку PVAS по аналоговой шкале от нуля до десяти, причем оценка "нуль" представляет собой отсутствие зуда/выкусывания, а оценка "десять" - непрерывный интенсивный зуд/выкусывание.

Безотносительно к данному объяснению, полагают, что настоящее изобретение воздействует на АДС, который считается многоаспектным заболеванием. Считается, что комбинация поляризации Th2 и наличия микроорганизмов при АДС может приводить к cIL-31-опосредованным эффектам, обуславливающим воспаление и прурит за счет иммунных клеток, кератиноцитов и прямой нейронной стимуляции, вызывающей зуд. Таким образом, индукция аутоантител к cIL-31 композициями и способами согласно настоящему изобретению у представителей семейства псовых, например, в частности, у домашних собак, снижает уровень cIL-31 и, тем самым, оказывает положительное воздействие на АДС путем ослабления зуда и, следовательно, расчесывания у собаки, подавляя все явления, обусловленные расчесыванием, в том числе воспаление и инфекцию.

Таким образом, в первом аспекте настоящего изобретения предложена композиция для применения в способе профилактики или лечения атопического дерматита собак (АДС) у представителей семейства псовых, предпочтительно домашней собаки, причем эффективное количество указанной композиции вводят указанному животному семейства псовых, предпочтительно указанной домашней собаке, и указанная композиция содержит (а) коровью частицу с по меньшей мере одним первым сайтом присоединения; и (b) по меньшей мере один антиген собачьего интерлейкина-31 (антиген cIL-31) с по меньшей мере одним вторым сайтом присоединения, причем указанный антиген cIL-31 содержит или, предпочтительно, состоит из белка с аминокислотной последовательностью, выбранной из SEQ ID NO: 22, или белка с аминокислотной последовательностью, обладающей по меньшей мере 90%, предпочтительно по меньшей мере 92%, более предпочтительно - по меньшей мере 95%, и еще более предпочтительно - по меньшей мере 98% идентичностью аминокислотной последовательности по отношению к SEQ ID NO: 22; причем компоненты (а) и (b) связаны посредством указанных по меньшей мере одного первого и по меньшей мере одного второго сайта присоединения за счет по меньшей мере одной непептидной ковалентной связи.

В предпочтительном варианте реализации указанная коровья частица представляет собой вирусоподобную частицу (VLP), предпочтительно рекомбинантную VLP. В дополнительном предпочтительном варианте реализации указанная VLP представляет собой модифицированную VLP вируса мозаики огурца (CMV), причем указанная модифицированная VLP CMV содержит, состоит или по существу состоит из по меньшей мере одного модифицированного полипептида CMV, причем указанный модифицированный полипептид CMV содержит или, предпочтительно, состоит из (а) полипептида CMV и (b) эпитопа Т-хелпера; причем указанный полипептид CMV содержит или, предпочтительно, состоит из (i) аминокислотной последовательности белка оболочки CMV; или (ii) мутированной аминокислотной последовательности, причем мутируемая аминокислотная последовательность представляет собой аминокислотную последовательность белка оболочки CMV, и указанная мутированная аминокислотная последовательность и указанный белок оболочки CMV демонстрируют идентичность последовательности по меньшей мере 90%, предпочтительно по меньшей мере 95%, более предпочтительно по меньшей мере 98%, и еще более предпочтительно - по меньшей мере 99%. В дополнительном крайнем предпочтительном варианте реализации указанный полипептид CMV содержит или, предпочтительно, состоит из (а) аминокислотной последовательности белка оболочки CMV, причем указанная аминокислотная последовательность содержит или, предпочтительно, состоит из SEQ ID NO: 1, или (b) аминокислотной последовательности, обладающей идентичностью последовательности по меньшей мере 90% по отношению к SEQ ID NO: 1; и указанная аминокислотная последовательность, определенная в (а) или (b) данного пункта формулы изобретения, содержит SEQ ID NO: 23; или указанная аминокислотная последовательность, определенная в (а) или (b) данного пункта формулы изобретения, содержит область аминокислотной последовательности, причем указанная область аминокислотной последовательности обладает идентичностью последовательности по меньшей мере 90% по отношению к SEQ ID NO: 23. В дополнительном крайнем предпочтительном варианте реализации указанная VLP представляет собой модифицированную VLP вируса мозаики огурца (CMV), причем указанный модифицированный полипептид CMV содержит, предпочтительно-состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 7.

В дополнительном крайнем предпочтительном варианте реализации указанный по меньшей мере один антиген cIL-31 содержит или, предпочтительно, состоит из белка с аминокислотной последователь-

ностью, выбранной из: (a) SEQ ID NO: 18; (b) SEQ ID NO: 21; (c) SEQ ID NO: 22; или (d) SEQ ID NO: 25-30. В дополнительном крайне предпочтительном варианте реализации указанный по меньшей мере один антиген cIL-31 содержит или, предпочтительно, состоит из белка с аминокислотной последовательностью, выбранной из: (a) SEQ ID NO: 18; (b) SEQ ID NO: 21; (c) SEQ ID NO: 22; (d) SEQ ID NO: 25 или (e) SEQ ID NO: 26. В дополнительном крайне предпочтительном варианте реализации указанный второй сайт присоединения представляет собой сульфгидрильную группу, причем, предпочтительно, указанная сульфгидрильная группа получена в результате реакции указанного антигена cIL-31 с N-сукцинимидил-S-ацетилтиоацетатом (SATA). В дополнительном крайне предпочтительном варианте реализации указанный второй сайт присоединения представляет собой сульфгидрильную группу, причем, предпочтительно, указанная сульфгидрильная группа получена в результате реакции остатка лизина с указанным антигеном cIL-31.

В дополнительном аспекте настоящего изобретения предложена иммуногенная или вакцинная композиция, содержащая эффективное количество указанной композиции согласно настоящему изобретению, причем, предпочтительно, указанная иммуногенная или вакцинная композиция дополнительно содержит адъювант.

В дополнительном аспекте настоящего изобретения предложена фармацевтическая композиция, содержащая: (a) композицию согласно настоящему изобретению или иммуногенную или вакцинную композицию; и (b) фармацевтически приемлемый носитель.

В дополнительном аспекте настоящего изобретения предложен способ иммунизации, причем указанный способ включает введение человеку композиции согласно настоящему изобретению, иммуногенной или вакцинной композиции по настоящему изобретению или фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению.

В дополнительном аспекте настоящего изобретения предложена композиция согласно настоящему изобретению, иммуногенная или вакцинная композиция согласно настоящему изобретению или фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению для применения в качестве лекарственного средства.

В дополнительном аспекте настоящего изобретения предложена композиция согласно настоящему изобретению, иммуногенная или вакцинная композиция согласно настоящему изобретению или фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению для применения в способе профилактики или лечения атопического дерматита собак (АДС) у домашней собаки, причем эффективное количество указанной композиции согласно настоящему изобретению, указанной иммуногенной или вакцинной композиции согласно настоящему изобретению или указанной фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению вводят указанной домашней собаке. Предпочтительно указанное введение указанной композиции согласно настоящему изобретению, указанной иммуногенной или вакцинной композиции согласно настоящему изобретению или указанной фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению ослабляет по меньшей мере один симптом указанного атопического дерматита собак (АДС) по сравнению с по меньшей мере одним симптомом до указанного введения.

В дополнительном аспекте настоящего изобретения предложен способ профилактики или лечения атопического дерматита собак (АДС) у домашней собаки, причем указанный способ включает введение эффективного количества указанной композиции согласно настоящему изобретению, указанной иммуногенной или вакцинной композиции согласно настоящему изобретению или указанной фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению указанной домашней собаке.

В еще одном аспекте настоящего изобретения предложено применение указанной композиции согласно настоящему изобретению, указанной иммуногенной или вакцинной композиции согласно настоящему изобретению или указанной фармацевтической композиции для производства лекарственного средства для профилактики или лечения атопического дерматита собак (АДС) у домашней собаки, причем в типичном и предпочтительном случае эффективное количество указанной композиции согласно настоящему изобретению, указанной иммуногенной или вакцинной композиции согласно настоящему изобретению или указанной фармацевтической композиции вводят указанной домашней собаке.

В еще одном аспекте настоящего изобретения предложена композиция для применения в способе профилактики или лечения атопического дерматита собак (АДС) у домашней собаки, причем эффективное количество указанной композиции вводят указанной домашней собаке, и указанная композиция содержит (a) коровую частицу с по меньшей мере одним первым сайтом присоединения, причем указанная коровая частица предпочтительно представляет собой вирусоподобную частицу (VLP), более предпочтительно - рекомбинантную VLP; и (b) по меньшей мере один антиген собачьего интерлейкина-31 (антиген cIL-31) с по меньшей мере одним вторым сайтом присоединения, причем указанный антиген cIL-31 содержит или, предпочтительно, состоит из белка с аминокислотной последовательностью, выбранной из SEQ ID NO: 22, или белка с аминокислотной последовательностью, обладающей по меньшей мере 90%, предпочтительно по меньшей мере 92%, более предпочтительно - по меньшей мере 95%, и еще более предпочтительно - по меньшей мере 98% идентичностью аминокислотной последовательности по отношению к SEQ ID NO: 22; причем компоненты (a) и (b) связаны посредством указанных по меньшей мере одного первого и по меньшей мере одного второго сайта присоединения за счет по меньшей мере одной

непептидной ковалентной связи.

В дополнительном аспекте настоящего изобретения предложена композиция, содержащая (а) вирусоподобную частицу (VLP) с по меньшей мере одним первым сайтом присоединения; (b) по меньшей мере один антиген собачьего интерлейкина-31 (антиген cIL-31) с по меньшей мере одним вторым сайтом присоединения, причем указанный антиген cIL-31 содержит или, предпочтительно, состоит из белка с аминокислотной последовательностью, выбранной из SEQ ID NO: 22, или белка с аминокислотной последовательностью, обладающей по меньшей мере 90%, предпочтительно по меньшей мере 92%, более предпочтительно - по меньшей мере 95%, и еще более предпочтительно - по меньшей мере 98% идентичностью аминокислотной последовательности по отношению к SEQ ID NO: 22; и, более предпочтительно, указанный антиген содержит или, предпочтительно, состоит из белка с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 22; причем компоненты (а) и (b) связаны посредством указанных по меньшей мере одного первого и по меньшей мере одного второго сайта присоединения за счет по меньшей мере одной непептидной ковалентной связи.

В дополнительном крайне предпочтительном варианте реализации указанная VLP представляет собой модифицированную VLP вируса мозаики огурца (CMV), причем указанный модифицированный полипептид CMV содержит, предпочтительно состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 7.

В дополнительном крайне предпочтительном варианте реализации указанный по меньшей мере один антиген cIL-31 содержит или, предпочтительно, состоит из белка с аминокислотной последовательностью, выбранной из: (а) SEQ ID NO: 18; (b) SEQ ID NO: 21; (c) SEQ ID NO: 22; или (d) SEQ ID NO: 25-30. В дополнительном крайне предпочтительном варианте реализации указанный по меньшей мере один антиген cIL-31 содержит или, предпочтительно, состоит из белка с аминокислотной последовательностью, выбранной из: (а) SEQ ID NO: 18; (b) SEQ ID NO: 21; (c) SEQ ID NO: 22; (d) SEQ ID NO: 25 или (e) SEQ ID NO: 26. В дополнительном крайне предпочтительном варианте реализации указанный второй сайт присоединения представляет собой сульфгидрильную группу, причем, предпочтительно, указанная сульфгидрильная группа получена в результате реакции указанного антигена cIL-31 с N-сукцинимидил-S-ацетилтиоацетатом (SATA). В дополнительном крайне предпочтительном варианте реализации указанный второй сайт присоединения представляет собой сульфгидрильную группу, причем, предпочтительно, указанная сульфгидрильная группа получена в результате реакции остатка лизина с указанным антигеном cIL-31.

Дополнительные аспекты и варианты реализации настоящего изобретения станут очевидны по мере продолжения данного описания.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1. Карта плазмиды pET-CMVwt. Обозначены относительные положения важных генов и сайты ферментов рестрикции.

Фиг. 2А. Динамическое светорассеяние очищенных VLP CMVwt. Размер частиц определяли с помощью Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., Великобритания).

Фиг. 2В. Электронно-микроскопический анализ очищенных VLP CMVwt. Для морфологического анализа VLP использовали электронный микроскоп JEM-1230 (Jeol Ltd., Токио, Япония).

Фиг. 3. Масс-спектрометрический анализ очищенных VLP, полученных из CMV. Анализ посредством времяпролётной масс-спектрометрии с лазерной ионизацией и десорбцией из матрицы (MALDI-TOF) выполняли на Autoflex MS (Bruker Daltonik, Германия). Для определения массы использовали калибровочный стандарт II молекулярной массы (ММ) белка (22,3-66,5 кДа; Bruker Daltonik).

Фиг. 3А. CMV дикого типа ("дт"); теоретическая ММ=24069; найденная ММ=24058.

Фиг. 3В. CMV-Npadr; теоретическая ММ=24161 (без первого остатка Met); найденная ММ=24160.

Фиг. 3С. CMV-Ntt830; теоретическая ММ=24483 (без первого остатка Met); найденная ММ=24477.

Фиг. 4А. Динамическое светорассеяние очищенных VLP CMV-Ntt830. Размер частиц определяли с помощью Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., Великобритания).

Фиг. 4В. Электронно-микроскопический анализ очищенных VLP CMV-Ntt830. Для морфологического анализа VLP использовали электронный микроскоп JEM-1230 (Jeol Ltd., Токио, Япония).

Фиг. 5А. Динамическое светорассеяние очищенных VLP CMV-Npadr. Размер частиц определяли с помощью Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., Великобритания).

Фиг. 5В. Электронно-микроскопический анализ очищенных VLP CMV-Npadr. Для морфологического анализа VLP использовали электронный микроскоп JEM-1230 (Jeol Ltd., Токио, Япония).

Фиг. 6. Продукция cIL-31 с маркером 6xHis и С-концевым остатком цистеина в E.coli. Дорожка 1 - общий лизат клеток до индукции, дорожка 2 - общий лизат клеток после индукции, дорожка 3 - маркер. Положение белка cIL-31 указано стрелкой.

Фиг. 7. Очистка cIL-31 с маркером 6xHis и С-концевым остатком цистеина. Дорожка 1 - маркер, дорожка 2 - лизат клеток (растворимая фракция), дорожка 2 - экстракция осадка в буфере для промывки WB1, дорожка 2 - экстракция осадка в буфере для промывки WB2, дорожка 3 - экстракция осадка в буфере для элюирования EB, содержащем 8 М мочевины.

Фиг. 8А. Рефолдинг cIL-31 с маркером 6xHis и С-концевым остатком цистеина. Дорожка 1 - маркер,

дорожка 2 - нерастворимая фракция после рефолдинга, дорожка 3 - растворимая фракция после рефолдинга.

Фиг. 8В. Профиль гель-фильтрации cIL-31 с маркером 6xHis и С-концевым остатком цистеина после рефолдинга. Пик соответствует исключенному объему колонки, что указывает на агрегацию материала.

Фиг. 9. Продукция нативного рекомбинантного cIL-31 собаки. Дорожка 1 - общий лизат клеток до индукции, дорожка 2 - общий лизат клеток после индукции, дорожка 3 - маркер. Положение белка cIL-31 указано стрелкой.

Фиг. 10А. Очистка нативного рекомбинантного cIL-31 после рефолдинга на колонке для гель-фильтрации. Белок элюировался значительно позже исключенного объема колонки, что указывало на отсутствие агрегации материала.

Фиг. 10В. Анализ фракций пиков электрофорезом в ДСН-ПААГ.

Фиг. 11. Анализ cIL-31, присоединенного к VLP CMV, электрофорезом в ДСН-ПААГ. Дорожка 1 - маркер, дорожка 2 - VLP CMV, дорожка 3 - VLP CMV, обработанные SMPH, дорожка 4 - cIL31, дорожка 5 - cIL-31, присоединенный к VLP CMV. Продукт присоединения на дорожке 5 указан стрелками.

Фиг. 12. Электронная микроскопия VLP CMV-Ntt830 и тех же VLP с присоединенным cIL-31.

Фиг. 13А. Вакцинация против cIL-31 резко ослабляет расчесывание у вакцинированных собак с аллергией. Расчесывание в течение 6 часов после стимуляции экстрактом клеща домашней пыли до и после вакцинации.

Фиг. 13В. Корреляция отсутствия расчесывания с индукцией cIL-31 - специфических антител.

Подробное описание изобретения

Если не указано иное, все технические и научные термины, использованные в настоящем документе, имеют значение, совпадающее с общепринятым среди специалистов в области, к которой относится настоящее изобретение.

Вирусоподобная частица (VLP). Термин "вирусоподобная частица (VLP)" в настоящем документе относится к нереплицирующейся или неинфекционной, предпочтительно к нереплицирующейся и неинфекционной вирусной частице, или к нереплицирующейся или неинфекционной, предпочтительно к нереплицирующейся и неинфекционной структуре, напоминающей вирусную частицу, предпочтительно капсиду вируса. Термин "нереплицирующийся" в настоящем документе относится к неспособности реплицировать геном, содержащийся в VLP. Термин "неинфекционный" в настоящем документе относится к неспособности проникать в клетку-хозяина. Вирусоподобная частица в соответствии с настоящим изобретением является нереплицирующейся и неинфекционной, поскольку в ней полностью или частично отсутствует геном вируса или функция генома. Вирусоподобная частица в соответствии с настоящим изобретением может содержать нуклеиновую кислоту отдельно от своего генома. Рекомбинантные вирусоподобные частицы обычно содержат РНК из клетки-хозяина. Типичный и предпочтительный вариант вирусоподобной частицы в соответствии с настоящим изобретением представляет собой капсид вируса, состоящий из полипептидов согласно настоящему изобретению. Вирусоподобная частица обычно представляет собой макромолекулярный блок из белка оболочки вируса, который обычно содержит 60, 120, 180, 240, 300, 360 или более 360 субъединиц белка на вирусоподобную частицу. В типичном и предпочтительном случае взаимодействие этих субъединиц ведет к образованию вирусного капсида или структуры, подобной вирусному капсиду, с присущей ему повторяющейся организацией. Одной из особенностей вирусоподобной частицы является ее высокая упорядоченность и повторяющаяся компоновка ее субъединиц.

Вирусоподобная частица CMV. Термин "вирусоподобная частица CMV" или VLP CMV относится к вирусоподобной частице, содержащей или, предпочтительно, в основном состоящей из, или, предпочтительно, состоящей из по меньшей мере одного полипептида CMV. Предпочтительно вирусоподобная частица CMV содержит указанный полипептид CMV в качестве основного, и еще более предпочтительно - единственного белкового компонента структуры капсида. В типичном и предпочтительном случае вирусоподобные частицы CMV напоминают структуру капсида CMV. Вирусоподобные частицы CMV являются нереплицирующимися и неинфекционными, и в них отсутствуют по меньшей мере ген или гены, кодирующие механизмы репликации CMV, а также обычно отсутствуют ген или гены, кодирующие белок или белки, отвечающие за присоединение вируса к хозяину или за проникновение в него. В это определение также входят вирусоподобные частицы, в которых вышеупомянутые ген или гены по-прежнему присутствуют, но неактивны. Предпочтительные способы придания вирусоподобным частицам свойств нереплицируемости и/или неинфекционности представляют собой физическую или химическую инактивацию, например, УФ-облучение, обработку формальдегидом. Предпочтительно в VLP CMV отсутствуют ген или гены, кодирующие механизмы репликации CMV, а также отсутствуют ген или гены, кодирующие белок или белки, отвечающие за присоединение вируса к хозяину или за проникновение в него. Более предпочтительно, нереплицирующиеся и/или неинфекционные вирусоподобные частицы получают с использованием рекомбинантной генной технологии. Рекомбинантные вирусоподобные частицы CMV согласно настоящему изобретению в типичном и предпочтительном случае не содержат генома вируса. Настоящее изобретение также охватывает вирусоподобные частицы, содержащие полипептиды

более чем одного вида, обычно называемые мозаичными VLP. Так, в одном варианте реализации вирусоподобная частица согласно настоящему изобретению содержит полипептиды по меньшей мере двух различных видов, причем по меньшей мере один из указанных видов полипептидов представляет собой полипептид CMV. Предпочтительно, VLP CMV представляет собой макромолекулярный блок, состоящий из белка оболочки CMV и обычно содержащий 180 субъединиц белка оболочки на VLP. В типичном предпочтительном случае VLP CMV в настоящем документе содержит, состоит или по существу состоит из по меньшей мере одного полипептида CMV, содержащего или, предпочтительно, состоящего из (i) аминокислотной последовательности белка оболочки CMV; или (ii) мутированной аминокислотной последовательности, причем мутируемая аминокислотная последовательность представляет собой аминокислотную последовательность белка оболочки CMV, и указанная мутированная аминокислотная последовательность и указанная мутируемая аминокислотная последовательность демонстрируют идентичность последовательности по меньшей мере 90%, предпочтительно по меньшей мере 95%, более предпочтительно по меньшей мере 98%, и еще более предпочтительно - по меньшей мере 99%.

Полипептид. Термин "полипептид" в настоящем документе относится к полимеру, состоящему из аминокислотных мономеров, линейно соединенных пептидными связями (также известными как амидные связи). Термин "полипептид" относится к последовательной цепи аминокислот, а не к продуктам конкретной длины. Таким образом, определение полипептида включает пептиды и белки.

Полипептид вируса мозаики огурца (CMV). Термин "полипептид вируса мозаики огурца (CMV)" в настоящем документе относится к полипептиду, содержащему или, предпочтительно, состоящему из: (i) аминокислотной последовательности белка оболочки вируса мозаики огурца (CMV); или (ii) мутированной аминокислотной последовательности, причем мутируемая аминокислотная последовательность представляет собой аминокислотную последовательность белка оболочки CMV, и указанная мутированная аминокислотная последовательность и указанная мутируемая аминокислотная последовательность, т.е. указанный белок оболочки CMV, демонстрируют идентичность последовательности по меньшей мере 90%, предпочтительно по меньшей мере 95%, более предпочтительно по меньшей мере 98%, и еще более предпочтительно - по меньшей мере 99%. В типичном предпочтительном случае полипептид CMV может образовывать вирусоподобную частицу CMV при экспрессии путем самосборки.

Белок оболочки (CP) вируса мозаики огурца (CMV). Термин "белок оболочки (CP) вируса мозаики огурца (CMV)" в настоящем документе относится к белку оболочки вируса мозаики огурца, встречающемуся в природе. Из-за крайне широкого круга хозяев вируса мозаики огурца известно большое количество различных штаммов и изолятов CMV, и последовательности белков оболочки указанных штаммов и изолятов определены и, таким образом, также известны специалистам в данной области техники. Описаны последовательности указанных белков оболочки (CP) CMV; их можно получить из известных баз данных, например, Genbank, www.dpvweb.net, или www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/. Примеры описаны в заявке EP № 14189897.3. Типичные примеры белков оболочки CMV приведены в SEQ ID NO: 1-3. Следует отметить, что эти штаммы и изоляты характеризуются высокой аналогией последовательностей белков оболочки в различных доменах белка, в том числе на N-конце белка оболочки. В частности, 98,1% всех полностью секвенированных изолятов CMV обладают более чем 85% идентичностью последовательности в пределах первых 28 аминокислот последовательности белка оболочки, и 79,5% всех полностью секвенированных изолятов CMV обладают более чем 90% идентичностью последовательности в пределах первых 28 аминокислот последовательности белка оболочки.

В типичном предпочтительном случае белок оболочки CMV, применяемый в настоящем изобретении, может образовывать вирусоподобную частицу CMV при экспрессии путем самосборки. Предпочтительно, белок оболочки CMV, применяемый в настоящем изобретении, может образовывать вирусоподобную частицу CMV при экспрессии путем самосборки в *E. coli*.

Модифицированная вирусоподобная частица (VLP) вируса мозаики огурца (CMV). Термин "модифицированная вирусоподобная частица (VLP) вируса мозаики огурца (CMV)" в настоящем документе относится к VLP CMV, модифицированной таким образом, что она содержит или, предпочтительно, по существу состоит из, или, предпочтительно, состоит из по меньшей мере одного модифицированного полипептида CMV, причем указанный модифицированный полипептид CMV содержит или, предпочтительно, состоит из полипептида CMV, и эпитопа Т-хелпера. В типичном предпочтительном случае указанный эпитоп Т-хелпера (i) присоединен к N-концу указанного полипептида CMV, (ii) присоединен к C-концу указанного полипептида CMV, (iii) замещает область последовательных аминокислот указанного полипептида CMV, причем идентичность последовательности между указанной замещенной областью последовательных аминокислот указанного полипептида CMV и эпитопом Т-хелпера составляет по меньшей мере 15%, предпочтительно по меньшей мере 20%, или (iv) замещает N-концевую область указанного полипептида CMV, причем указанная замещаемая N-концевая область указанного полипептида CMV состоит из 5-15 последовательных аминокислот. Предпочтительно указанный эпитоп Т-хелпера замещает N-концевую область указанного полипептида CMV, причем указанная замещаемая N-концевая область указанного полипептида CMV состоит из 5-15 последовательных аминокислот, предпочтительно из 9-14 последовательных аминокислот, более предпочтительно - из 11-13 последовательных аминокислот, и наиболее предпочтительно - из 11, 12 или 13 последовательных аминокислот. Предпочтительно

указанная модифицированная VLP CMV согласно настоящему изобретению представляет собой рекомбинантную модифицированную VLP CMV.

Модифицированный полипептид CMV. Термин "модифицированный полипептид CMV" в настоящем документе относится к полипептиду CMV, модифицированному, как указано в настоящем документе, так, что указанный модифицированный полипептид CMV содержит или, предпочтительно, состоит из полипептида CMV и эпитопа Т-хелпера. В типичном случае модифицированный полипептид CMV может образовывать вирусоподобную частицу CMV при экспрессии путем самосборки. Предпочтительно, модифицированный полипептид CMV представляет собой рекомбинантный модифицированный полипептид CMV и может образовывать вирусоподобную частицу CMV при экспрессии путем самосборки в *E. coli*.

N-концевая область полипептида CMV. Термин "N-концевая область полипептида CMV" в настоящем документе относится к N-концу указанного полипептида CMV и, в частности, N-концу белка оболочки CMV, или к области N-конца указанного полипептида CMV или указанного белка оболочки CMV, но начинается со второй аминокислоты с N-конца указанного полипептида CMV или указанного белка оболочки CMV, если указанный полипептид CMV или указанный белок оболочки содержит N-концевой остаток метионина. Предпочтительно, в случае, если указанный полипептид CMV или указанный белок оболочки содержит N-концевой остаток метионина, с практической точки зрения стартовый кодон, кодирующий метионин, обычно делетируют и добавляют к N-концу эпитопа Th-клетки. В более предпочтительном случае необязательно можно вставить одну, две или три дополнительные аминокислоты, предпочтительно одну аминокислоту, между стартовым остатком метионина и эпитопом Th-клетки в целях клонирования. Термин "N-концевая область мутированной аминокислотной последовательности полипептида CMV или белка оболочки CMV" в настоящем документе относится к N-концу указанной аминокислотной последовательности указанного полипептида CMV или указанного белка оболочки CMV, или к области N-конца указанной мутированной аминокислотной последовательности указанного полипептида CMV или указанного белка оболочки CMV, но начинается со второй аминокислоты с N-конца указанной мутированной аминокислотной последовательности указанного полипептида CMV или указанного белка оболочки CMV, если указанная мутированная аминокислотная последовательность содержит N-концевой остаток метионина. Предпочтительно, в случае, если указанный полипептид CMV или указанный белок оболочки содержит N-концевой остаток метионина, с практической точки зрения стартовый кодон, кодирующий метионин, обычно делетируют и добавляют к N-концу эпитопа Th-клетки. В более предпочтительном случае необязательно можно вставить одну, две или три дополнительные аминокислоты, предпочтительно одну аминокислоту, между стартовым остатком метионина и эпитопом Th-клетки в целях клонирования.

Рекомбинантный полипептид. В контексте настоящего изобретения термин "рекомбинантный полипептид" относится к полипептиду, полученному с использованием процесса, включающего по меньшей мере один этап технологии рекомбинантных ДНК. В типичном предпочтительном случае рекомбинантный полипептид продуцируют в прокариотической системе экспрессии. Для специалиста очевидно, что рекомбинантно продуцируемые полипептиды, экспрессируемые в прокариотической системе экспрессии, например, *E. coli*, могут содержать N-концевой остаток метионина. N-концевой остаток метионина обычно отщепляется от рекомбинантного полипептида в экспрессирующем хозяине во время созревания рекомбинантного полипептида. Однако отщепление N-концевого остатка метионина может быть неполным. Таким образом, препарат рекомбинантного полипептида может содержать смесь полипептидов с N-концевым остатком метионина и без него, в остальном идентичных друг другу. В типичном предпочтительном случае препарат рекомбинантного полипептида содержит менее 10%, более предпочтительно - менее 5%, и еще более предпочтительно - менее 1% рекомбинантного полипептида с N-концевым остатком метионина.

Рекомбинантный полипептид CMV. Термин "рекомбинантный полипептид CMV" относится к полипептиду CMV, определение которого приведено выше, полученному с использованием процесса, включающего по меньшей мере один этап технологии рекомбинантных ДНК. В типичном предпочтительном случае препарат рекомбинантного полипептида CMV содержит менее 10%, более предпочтительно - менее 5%, и еще более предпочтительно - менее 1% рекомбинантного полипептида CMV с N-концевым остатком метионина. Следовательно, рекомбинантная вирусоподобная частица согласно настоящему изобретению может содержать рекомбинантные полипептиды с N-концевым остатком метионина и без него, в остальном идентичные друг другу.

Рекомбинантный модифицированный полипептид CMV. Термин "рекомбинантный модифицированный полипептид CMV" относится к модифицированному полипептиду CMV, определение которого приведено выше, полученному с использованием процесса, включающего по меньшей мере один этап технологии рекомбинантных ДНК. В типичном предпочтительном случае препарат рекомбинантного модифицированного полипептида CMV содержит менее 10%, более предпочтительно - менее 5%, и еще более предпочтительно - менее 1% рекомбинантного модифицированного полипептида CMV с N-концевым остатком метионина. Следовательно, рекомбинантная вирусоподобная частица согласно настоящему изобретению может содержать рекомбинантные полипептиды с N-концевым остатком метио-

нина и без него, в остальном идентичные друг другу.

Рекомбинантная вирусоподобная частица. В контексте настоящего изобретения термин "рекомбинантная вирусоподобная частица" относится к вирусоподобной частице (VLP), полученной с использованием процесса, включающего по меньшей мере один этап технологии рекомбинантных ДНК. В типичном предпочтительном случае рекомбинантная вирусоподобная частица содержит по меньшей мере один рекомбинантный полипептид, предпочтительно рекомбинантный полипептид CMV или рекомбинантный модифицированный полипептид CMV. В наиболее предпочтительном случае рекомбинантная вирусоподобная частица содержит или состоит из рекомбинантных полипептидов CMV или рекомбинантных модифицированных полипептидов CMV. Следовательно, если в контексте настоящего изобретения определение рекомбинантных VLP согласно настоящему изобретению оформлено со ссылкой на конкретные аминокислотные последовательности, содержащие N-концевой остаток метионина, область этих рекомбинантных VLP согласно настоящему изобретению охватывает VLP, образованные указанными конкретными аминокислотными последовательностями без указанного N-концевого остатка метионина, а также, обычно в незначительном количестве, как указано в настоящем документе, VLP, образованные указанными конкретными аминокислотными последовательностями с указанным N-концевым остатком метионина. Более того, если определение рекомбинантных VLP оформлено со ссылкой на конкретные аминокислотные последовательности, содержащие N-концевой остаток метионина, область настоящего изобретения охватывает VLP, содержащие как аминокислотные последовательности, содержащие указанный N-концевой остаток метионина, так и аминокислотные последовательности без N-концевого остатка метионина.

Мутированная аминокислотная последовательность. Термин "мутированная аминокислотная последовательность" относится к аминокислотной последовательности, полученной путем внедрения заданного набора мутаций в мутируемую аминокислотную последовательность. В контексте настоящего изобретения указанная мутируемая аминокислотная последовательность в типичном предпочтительном случае представляет собой аминокислотную последовательность белка оболочки CMV. Таким образом, мутированная аминокислотная последовательность отличается от аминокислотной последовательности белка оболочки CMV по меньшей мере на один аминокислотный остаток, причем указанная мутированная аминокислотная последовательность и указанная аминокислотная последовательность демонстрируют идентичность последовательности, равную по меньшей мере 90%. В типичном предпочтительном случае указанная мутированная аминокислотная последовательность и указанная мутируемая аминокислотная последовательность демонстрируют идентичность последовательности, равную по меньшей мере 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99%. Предпочтительно указанная мутированная аминокислотная последовательность и указанная мутируемая последовательность отличаются не более чем на 11, 10, 9, 8, 7, 6, 4, 3, 2 или 1 аминокислотный остаток, причем, более предпочтительно, указанное различие выбрано из инсерции, делеции и аминокислотной замены. Предпочтительно мутированная аминокислотная последовательность отличается от аминокислотной последовательности белка оболочки CMV по меньшей мере на одну аминокислоту, причем указанное различие представляет собой аминокислотную замену.

Положение, соответствующее остаткам... Положение в аминокислотной последовательности, соответствующее заданным остаткам другой аминокислотной последовательности, можно установить путем выравнивания последовательностей, в типичном предпочтительном случае с использованием алгоритма BLASTP, наиболее предпочтительно - с использованием стандартных настроек. Типичные и предпочтительные стандартные настройки представляют собой: порог ожидания: 10; размер слова: 3; максимальное количество совпадений в диапазоне запроса: 0; матрица: BLOSUM62; штраф за разрыв: наличие 11, продолжение 1; композиционная коррекция: условная композиционная коррекция на основе балльной матрицы.

Идентичность последовательности. Идентичность последовательности двух заданных аминокислотных последовательностей определяют на основании выравнивания обеих последовательностей. Алгоритмы определения идентичности последовательностей доступны для специалистов. Предпочтительно идентичность двух аминокислотных последовательностей определяют с использованием общедоступных компьютерных программ оценки гомологии, например, программы "BLAST" (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) или "CLUSTALW" (<http://www.genome.jp/tools/clustalw/>) и, в настоящем документе, программы "BLAST", представленной на главной странице NCBI <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, с использованием настроек по умолчанию, представленных в этой программе. Типичные и предпочтительные стандартные настройки представляют собой: порог ожидания: 10; размер слова: 3; максимальное количество совпадений в диапазоне запроса: 0; матрица: BLOSUM62; штраф за разрыв: наличие 11, продолжение 1; композиционная коррекция: условная композиционная коррекция на основе балльной матрицы.

Аминокислотная замена. Термин "аминокислотная замена" относится к замене заданного аминокислотного остатка в аминокислотной последовательности другим аминокислотным остатком, обладающим другой химической структурой, предпочтительно другим протеогенным аминокислотным остатком. Таким образом, в отличие от инсерции или делеции аминокислоты, аминокислотная замена не изменяет общего количества аминокислот указанной аминокислотной последовательности. В контексте настоящего

го изобретения крайне предпочтительна замена аминокислотного остатка указанной мутируемой аминокислотной последовательности остатком лизина или остатком цистеина.

Эпитоп. Термин "эпитоп" относится к непрерывным или прерывистым фрагментам антигена, предпочтительно полипептида, причем указанные фрагменты могут быть специфически связаны антителом или Т-клеточным рецептором в контексте молекулы МНС. По отношению к антителам специфическое связывание исключает неспецифическое связывание, но не обязательно исключает перекрестную реакционную способность. Эпитоп обычно содержит 5-20 аминокислот в пространственной конформации, уникальной для антигенного сайта.

Эпитоп Т-хелпера (Th-клетки). Термин "эпитоп Т-хелпера (Th-клетки)" в настоящем документе относится к эпитопу, который может распознавать хелперная Th-клетка. В еще одном предпочтительном варианте реализации указанный эпитоп Т-хелпера представляет собой универсальный эпитоп Т-хелпера.

Универсальный эпитоп Th-клетки. Термин "универсальный эпитоп Th-клетки" в настоящем документе относится к эпитопу Th-клетки, который может связываться с по меньшей мере одной, предпочтительно - более чем с одной молекулой МНС II класса. Простейший способ определить, является ли пептидная последовательность универсальным эпитопом Th-клетки, - измерить способность этого пептида связываться с отдельными молекулами МНС II класса. Это измерение можно выполнить по способности пептида конкурировать за связывание с известным пептидом эпитопа Th-клетки с молекулой МНС II класса. Типичный выбор молекул HLA-DR описан, например, в статье Alexander J, et al., *Immunity* (1994) 1:751-761. Сродство эпитопов Th-клеток к молекулам МНС II класса должно составлять по меньшей мере 10^{-5} М. Альтернативный, более трудоемкий, но и более обоснованный способ определения "универсальности" эпитопа Th-клетки - демонстрация того, что у большей доли людей (>30%) генерируется измеримый Т-клеточный ответ при иммунизации и повторной иммунизации через месяц белком, содержащим эпитоп Th-клетки, в составе с IFA. Типичная коллекция молекул МНС II класса, присутствующих у различных индивидов, приведена в статье Panina-Bordignon P, et al., *Eur J Immunol* (1989) 19:2237-2242. Как следствие, термин "универсальный эпитоп Th-клетки" в настоящем документе предпочтительно относится к эпитопу Th-клетки, генерирующему измеримый Т-клеточный ответ при иммунизации и повторной иммунизации (через один месяц, белком, содержащим эпитоп Th-клетки, в составе с IFA) у более чем 30% индивидов в выбранной группе, как описано в статье Panina-Bordignon P, et al., *Eur J Immunol* (1989) 19:2237-2242. Кроме того, в более предпочтительном случае, термин "универсальный эпитоп Th-клетки" в настоящем документе предпочтительно относится к эпитопу Th-клетки, способному связываться с по меньшей мере одним, предпочтительно по меньшей мере двумя, более предпочтительно - по меньшей мере тремя аллелями DR, выбранными из DR1, DR2w2b, DR3, DR4w4, DR4w14, DR5, DR7, DR52a, DRw53, DR2w2a; и предпочтительно выбранными из DR1, DR2w2b, DR4w4, DR4w14, DR5, DR7, DRw53, DR2w2a, со сродством, составляющим по меньшей мере 500 нМ (как описано в статье Alexander J, et al., *Immunity* (1994) 1:751-761 и источниках, цитируемых в настоящем документе); предпочтительный анализ связывания для оценки указанного сродства представляет собой анализ, описанный в работе Sette A, et al., *J Immunol* (1989) 142:35-40. Еще более предпочтительным образом, термин "универсальный эпитоп Th-клетки" в настоящем документе относится к эпитопу Th-клетки, способному связываться с по меньшей мере одним, предпочтительно по меньшей мере двумя, более предпочтительно - по меньшей мере тремя аллелями DR, выбранными из DR1, DR2w2b, DR4w4, DR4w14, DR5, DR7, DRw53, DR2w2a, со сродством, составляющим по меньшей мере 500 нМ (как описано в статье Alexander J, et al., *Immunity* (1994) 1:751-761 и источниках, цитируемых в настоящем документе); предпочтительный анализ связывания для оценки указанного сродства представляет собой анализ, описанный в работе Sette A, et al., *J Immunol* (1989) 142:35-40.

Универсальные эпитопы Th-клеток известны специалистам в данной области техники и описаны, например, в работах Alexander J, et al., *Immunity* (1994) 1:751-761, Panina-Bordignon P, et al., *Eur J Immunol* (1989) 19:2237-2242, Calvo-Calle JM, et al., *J Immunol* (1997) 159:1362-1373, и Valmori D, et al., *J Immunol* (1992) 149:717-721.

Адьювант. Термин "адьювант" в настоящем документе относится к неспецифическим стимуляторам иммунного ответа или веществам, обеспечивающим образование депо в организме хозяина, которые в комбинации с вакциной и фармацевтической композицией, соответственно, согласно настоящему изобретению, могут обеспечить индукцию усиленного иммунного ответа. Предпочтительными адьювантами являются полный и неполный адьювант Фрейнда, алюминийсодержащий адьювант, предпочтительно, гидроксид алюминия, и модифицированный мурамилдипептид. Дополнительные предпочтительные адьюванты представляют собой минеральные гели, например, гидроксид алюминия, поверхностно-активные вещества, например, лизолецитин, плурониловые полиолы, полианионы, пептиды, масляные эмульсии, гемоцианин лимфы улитки, динитрофенол, и адьюванты для медицинского применения, например, БЦЖ (бацилла Кальмета-Герена) и *Corynebacterium parvum*. Такие адьюванты хорошо известны в данной области техники. Дополнительные адьюванты, которые можно вводить с композициями согласно настоящему изобретению, включают монофосфорилипидный иммуномодулятор, AdjuVax 100a, QS-21, QS-18, CRL1005, соли алюминия (квасцы), MF-59, OM-174, OM-197, OM-294 и технологию вирусомальных адьювантов, но не ограничиваются ими. Адьюванты также могут содержать смеси этих ве-

ществ. Вирусоподобные частицы в общем случае описываются как адъювант. Однако термин "адъювант" в контексте настоящей заявки относится к адъюванту, не являющемуся вирусоподобной частицей согласно настоящему изобретению. Вместо этого термин "адъювант" имеет отношение к дополнительному отдельному компоненту композиций согласно настоящему изобретению, вакцин или фармацевтических композиций.

Эффективное количество. В настоящем документе термин "эффективное количество" относится к количеству, необходимому или достаточному для получения желательного биологического эффекта. Эффективное количество композиции, или, в альтернативном случае, фармацевтической композиции, должно представлять собой количество, позволяющее достичь выбранного результата, и такое количество может определить специалист в данной области техники посредством какого-либо способа или процедуры. Предпочтительно термин "эффективное количество" в настоящем документе относится к количеству, необходимому или достаточному для эффективного снижения уровня cIL-31 до уровня, вызывающего ослабление зуда у собак и улучшение АДС. Предпочтительно термин "эффективное количество" в настоящем документе относится к количеству, необходимому или достаточному для эффективной нейтритализации активности cIL-31 в областях воспаления. Эффективное количество зависит от конкретной вводимой композиции и размера субъекта. Специалист может эмпирически определить эффективное количество конкретной композиции согласно настоящему изобретению, не требуя излишних экспериментов.

Лечение. В настоящем документе термины "лечение", "лечить", "получивший лечение" или "подвергаемый лечению" относятся к профилактике и/или терапии. В одном варианте реализации термины "лечение", "лечить", "получивший лечение" или "подвергаемый лечению" относятся к терапевтическому лечению. В еще одном варианте реализации термины "лечение", "лечить", "получивший лечение" или "подвергаемый лечению" относятся к профилактическому лечению.

Сайт присоединения, первый. В настоящем документе фраза "первый сайт присоединения" относится к элементу, встречающемуся в вирусоподобной частице в естественных условиях или искусственно добавленному к вирусоподобной частице, с которым можно связать второй сайт присоединения. Первый сайт присоединения предпочтительно представляет собой белок, полипептид, аминокислоту, пептид, углевод, полинуклеотид, природный или синтетический полимер, вторичный метаболит или соединение (биотин, флуоресцеин, ретинол, дигоксигенин, ионы металлов, полиметилсульфонилфторид) или химически реакционноспособную группу, например, аминогруппу, карбоксильную группу, сульфгидрильную группу, гидроксильную группу, гуанидильную группу, гистидинильную группу или их комбинацию. Предпочтительный вариант реализации химически реакционноспособной группы, являющейся первым сайтом присоединения, представляет собой аминогруппу аминокислотного остатка, предпочтительно остатка лизина. Первый сайт присоединения обычно расположен на поверхности, предпочтительно на внешней поверхности VLP. Множественные первые сайты присоединения присутствуют на поверхности, предпочтительно на внешней поверхности VLP, обычно в повторяющейся конфигурации. В предпочтительном варианте реализации первый сайт присоединения ассоциируется с VLP за счет по меньшей мере одной ковалентной связи, предпочтительно за счет по меньшей мере одной пептидной связи. В дополнительном предпочтительном варианте реализации первый сайт присоединения встречается в VLP в естественных условиях. В качестве альтернативы, в предпочтительном варианте реализации первый сайт присоединения искусственно добавлен к VLP. В крайне предпочтительном варианте реализации указанный первый сайт присоединения представляет собой аминогруппу остатка лизина аминокислотной последовательности указанного полипептида VLP.

Сайт присоединения, второй. В настоящем документе фраза "второй сайт присоединения" относится к элементу, встречающемуся в естественных условиях или искусственно добавленному к антигену cIL-31, с которым можно связать первый сайт присоединения. Второй сайт присоединения антигена cIL-31 предпочтительно представляет собой белок, полипептид, пептид, аминокислоту, углевод, полинуклеотид, природный или синтетический полимер, вторичный метаболит или соединение (биотин, флуоресцеин, ретинол, дигоксигенин, ионы металлов, полиметилсульфонилфторид) или химически реакционноспособную группу, например, аминогруппу, карбоксильную группу, сульфгидрильную группу, гидроксильную группу, гуанидильную группу, гистидинильную группу или их комбинацию. Предпочтительный вариант реализации химически реакционноспособной группы, являющейся вторым сайтом присоединения, представляет собой сульфгидрильную группу, предпочтительно сульфгидрильную группу аминокислоты цистеина, наиболее предпочтительно - сульфгидрильную группу остатка цистеина. Таким образом, термин "антиген с по меньшей мере одним вторым сайтом присоединения" или "антиген cIL-31 с по меньшей мере одним вторым сайтом присоединения" относится к конструкту, содержащему антиген cIL-31 и по меньшей мере один второй сайт присоединения. В то же время, в частности, для второго сайта присоединения, не встречающегося в антигене cIL-31 в естественных условиях, такой конструкт в типичном предпочтительном случае дополнительно содержит "линкер". В еще одном предпочтительном варианте реализации второй сайт присоединения ассоциируется с антигеном cIL-31 за счет по меньшей мере одной ковалентной связи, предпочтительно за счет по меньшей мере одной пептидной связи. В дополнительном варианте реализации второй сайт присоединения встречается в антигене cIL-31 в естес-

венных условиях. В еще одном дополнительном крайне предпочтительном варианте реализации второй сайт присоединения искусственно добавлен к антигену cIL-31 посредством линкера, причем указанный линкер содержит или, в альтернативном случае, состоит из цистеина. Предпочтительно этот линкер присоединен к антигену cIL-31 посредством пептидной связи или добавлен путем образования химической связи.

Связанный. Термины "связанный" или "связывание" в настоящем документе относятся ко всевозможным способам, предпочтительно химическому взаимодействию, посредством которых по меньшей мере один первый сайт присоединения и по меньшей мере один второй сайт присоединения соединяются друг с другом. Химическое взаимодействие включает ковалентные и нековалентные взаимодействия. Типичные примеры нековалентного взаимодействия представляют собой ионные взаимодействия, гидрофобные взаимодействия или водородные связи, в то время как ковалентные взаимодействия основаны, например, на ковалентных связях, например, сложноэфирных, эфирных, фосфоэфирных связях, связях углерод-фосфор, связях углерод-сера, например, тиоэфирных, или имидных связях. В некоторых предпочтительных вариантах реализации первый сайт присоединения и второй сайт присоединения связаны посредством по меньшей мере одной ковалентной связи, предпочтительно по меньшей мере одной непептидной связи, и еще более предпочтительно - посредством исключительно непептидной(ых) связи(ей). В то же время термин "связанный" в настоящем документе не должен относиться только к непосредственной связи по меньшей мере одного первого сайта присоединения и по меньшей мере одного второго сайта присоединения, но и, в альтернативном предпочтительном случае, к непрямой связи по меньшей мере одного первого сайта присоединения и по меньшей мере одного второго сайта присоединения посредством промежуточных(ой) молекул(ы), и в типичном предпочтительном случае с использованием по меньшей мере одного, предпочтительно одного гетеробифункционального перекрестного линкера. В других предпочтительных вариантах реализации первый сайт присоединения и второй сайт присоединения связаны посредством по меньшей мере одной ковалентной связи, предпочтительно по меньшей мере одной пептидной связи, и еще более предпочтительно исключительно пептидной(ых) связи(ей).

Линкер: "Линкер" в настоящем документе соединяет второй сайт присоединения с антигеном cIL-31 или уже содержит, по существу состоит или состоит из второго сайта присоединения. Предпочтительно "линкер" в настоящем документе уже содержит второй сайт присоединения, в типичном предпочтительном случае, но не обязательно - в виде одного аминокислотного остатка, предпочтительно в виде остатка цистеина. Предпочтительные линкеры являются аминокислотными линкерами, т.е. Линкерами, содержащими по меньшей мере один аминокислотный остаток. Термин "аминокислотный линкер" не подразумевает, что такой линкер состоит исключительно из аминокислотных остатков. В то же время линкер, состоящий исключительно из аминокислотных остатков, является предпочтительным вариантом реализации настоящего изобретения. Аминокислотные остатки линкера предпочтительно состоят из природных аминокислот или неприродных аминокислот, известных в данной области техники, всех L-или всех D-аминокислот или их смесей. Дополнительные предпочтительные варианты реализации линкера в соответствии с настоящим изобретением представляют собой молекулы, содержащие сульфгидрильную группу или остаток цистеина, и такие молекулы, следовательно, входят в область настоящего изобретения. Ассоциация линкера с антигеном cIL-31 предпочтительно осуществляется посредством по меньшей мере одной ковалентной связи, более предпочтительно - посредством по меньшей мере одной пептидной связи.

Упорядоченная и повторяющаяся антигенная матрица. В настоящем документе термин "упорядоченная и повторяющаяся антигенная матрица" относится к повторяющемуся рисунку из молекул антигена cIL-31, в типичном предпочтительном случае характеризующемуся высокой степенью однородности пространственного расположения таких молекул антигена по отношению к коровой частице и VLP, соответственно. В одном варианте реализации настоящего изобретения этот повторяющийся рисунок может представлять собой геометрический рисунок. Кроме того, предпочтительные упорядоченные и повторяющиеся антигенные матрицы характеризуются строго повторяющимися паракристаллическими последовательностями молекул антигена cIL-31, предпочтительно с промежутком от 1 до 30 нанометров, предпочтительно от 2 до 15 нанометров, более предпочтительно - от 2 до 10 нанометров, еще более предпочтительно - от 2 до 8 нанометров, и еще более предпочтительно - от 1,6 до 7 нанометров.

Иммуностимулирующее вещество. В настоящем документе термин "иммуностимулирующее вещество" относится к веществу, способному индуцировать и/или усиливать иммунный ответ. Иммуностимулирующие вещества в настоящем документе включают вещества, активирующие Toll-подобные рецепторы, и вещества, индуцирующие секрецию цитокинов, но не ограничиваются ими. Вещества, активирующие Toll-подобные рецепторы, включают иммуностимулирующие нуклеиновые кислоты, пептидогликаны, липополисахариды, липотейхоевые кислоты, имидазохинолиновые соединения, флагеллины, липопротеины и иммуностимулирующие органические соединения, например, таксол.

Иммуностимулирующая нуклеиновая кислота (ISS-HK). В настоящем документе термин "иммуностимулирующая нуклеиновая кислота" относится к нуклеиновой кислоте, способной индуцировать и/или усиливать иммунный ответ. Иммуностимулирующие нуклеиновые кислоты включают рибонуклеиновые кислоты и, в частности, дезоксирибонуклеиновые кислоты, причем как рибонуклеиновые, так и дезокси-

рибонуклеиновые кислоты могут быть двуцепочечными или одноцепочечными. Предпочтительные ISS-НК представляют собой дезоксирибонуклеиновые кислоты, причем в дополнительном предпочтительном случае указанные дезоксирибонуклеиновые кислоты являются одноцепочечными. Предпочтительно иммуностимулирующие нуклеиновые кислоты содержат по меньшей мере один CpG-мотив, содержащий неметилированный С. Крайне предпочтительные иммуностимулирующие нуклеиновые кислоты содержат по меньшей мере один CpG-мотив, причем указанный по меньшей мере один CpG-мотив содержит или, предпочтительно, состоит из по меньшей мере одного, предпочтительно одного динуклеотида CG, причем С является неметилированным. Предпочтительно, но не обязательно указанный динуклеотид CG является частью палиндромной последовательности. Термин "иммуностимулирующая нуклеиновая кислота" также относится к нуклеиновым кислотам, содержащим модифицированные основания, предпочтительно 4-бромцитозин. Особенно предпочтительными в контексте настоящего изобретения являются ISS-НК, способные стимулировать продукцию ИФН-альфа в дендритных клетках. Иммуностимулирующие нуклеиновые кислоты, подходящие для целей настоящего изобретения, описаны, например, в заявке WO2007/068747A1.

Олигонуклеотид. В настоящем документе термин "олигонуклеотид" относится к нуклеотидной последовательности, содержащей 2 или более нуклеотидов, предпочтительно от приблизительно 6 до приблизительно 200 нуклеотидов, более предпочтительно - от 20 до приблизительно 200 нуклеотидов, и наиболее предпочтительно - от 20 до 40 нуклеотидов. В крайне предпочтительном случае олигонуклеотиды содержат приблизительно 30 нуклеотидов, более предпочтительно олигонуклеотиды содержат ровно 30 нуклеотидов, и наиболее предпочтительно олигонуклеотиды состоят из ровно 30 нуклеотидов. Олигонуклеотиды представляют собой полирибонуклеотиды или полидезоксирибонуклеотиды, предпочтительно выбранные из (а) немодифицированной РНК или ДНК и (b) модифицированной РНК или ДНК. Эта модификация может включать аналоги каркаса или нуклеотидов. Олигонуклеотиды предпочтительно выбирают из группы, состоящей из (а) одно- или двуцепочечной ДНК, (b) ДНК, являющейся смесью одно- и двуцепочечных областей, (с) одно- или двуцепочечной РНК, (d) РНК, являющейся смесью одно- и двуцепочечных областей, и (е) гибридных молекул, содержащих ДНК и РНК, являющиеся одноцепочечными или, более предпочтительно, двуцепочечными или представляющие собой смесь одно- и двуцепочечных областей. Предпочтительные модификации/аналоги нуклеотидов выбирают из группы, состоящей из (а) пептидной нуклеиновой кислоты, (b) инозина, (с) тритилированных оснований, (d) фосфортиоатов, (е) алкилфосфортиоатов, (f) 5-нитроиндолдезоксирибофуранозила, (g) 5-метилдезокситозина и (h) 5,6-дигидро-5,6-дигидродезокситимидина. Фосфортиоатные нуклеотиды защищены от разложения в клетке или организме и поэтому являются предпочтительными модификациями нуклеотидов. Немодифицированные олигонуклеотиды, состоящие исключительно из нуклеотидов, соединенных фосфодиэфирными связями, обычно более активны, чем модифицированные нуклеотиды, и поэтому в общем случае являются предпочтительными в контексте настоящего изобретения. Наиболее предпочтительны олигонуклеотиды, состоящие исключительно из дезоксинуклеотидов, соединенных фосфодиэфирными связями, причем более предпочтительные указанные олигонуклеотиды являются одноцепочечными. Еще более предпочтительны олигонуклеотиды, способные стимулировать продукцию ИФН-альфа в клетках, предпочтительно в дендритных клетках. Крайне предпочтительные олигонуклеотиды, способные стимулировать продукцию ИФН-альфа в клетках, выбирают из CpG типа А и CpG типа С. Еще более предпочтительными являются молекулы РНК без кэпа.

Мотив CpG. В настоящем документе термин "мотив CpG" относится к нуклеотидной структуре, включающей неметилированный центральный CpG, т.е. неметилированный динуклеотид CpG, в котором С является неметилированным, окруженный по меньшей мере одним основанием, предпочтительно по меньшей мере одним или двумя нуклеотидами, фланкирующими (с 3'- и 5'-стороны) центральный CpG. В типичном предпочтительном случае мотив CpG в настоящем документе содержит или, в альтернативном случае, состоит из неметилированного динуклеотида CpG и двух нуклеотидов на его 5'- и 3'-концах. Безотносительно к теоретическим представлениям, основания, фланкирующие CpG, обуславливают значительную часть активности олигонуклеотида CpG.

Олигонуклеотид, содержащий неметилированный CpG. В настоящем документе термин "олигонуклеотид, содержащий неметилированный CpG" или "CpG" относится к олигонуклеотиду, предпочтительно к олигодезоксинуклеотиду, содержащему по меньшей мере один мотив CpG. Таким образом, CpG содержит по меньшей мере один динуклеотид из неметилированного цитозина и гуанина. Предпочтительные CpG стимулируют/активируют, например, оказывают митогенное действие на клетки, происходящими из костного мозга позвоночных, или индуцируют или увеличивают экспрессию цитокинов этими клетками. Например, CpG можно применять для активации В-клеток, НК-клеток и антигенпрезентирующих клеток, например, дендритных клеток, моноцитов и макрофагов. Предпочтительно CpG имеют отношение к олигодезоксинуклеотиду, предпочтительно к одноцепочечному олигодезоксинуклеотиду, содержащему неметилированный цитозин, после которого с 3'-стороны расположен гуанозин, причем указанный неметилированный цитозин и указанный гуанозин соединены фосфатной связью, причем, в предпочтительном случае, указанная фосфатная связь представляет собой фосфодиэфирную связь или фосфотиоатную связь, и, более предпочтительно, указанная фосфатная связь представляет собой фосфо-

дизфирную связь. CpG могут содержать аналоги нуклеотидов, например, аналоги, содержащие фосфотиозфирные связи, и могут быть двуцепочечными или одноцепочечными. В общем случае двуцепочечные молекулы более стабильны *in vivo*, в то время как одноцепочечные молекулы обладают повышенной иммунной активностью. Предпочтительно в настоящем документе CpG представляет собой олигонуклеотид длиной по меньшей мере десять нуклеотидов, содержащий по меньшей мере один мотив CpG, причем длина более предпочтительного указанного CpG составляет от 10 до 60, более предпочтительно - от 15 до 50, более предпочтительно - от 20 до 40, еще более предпочтительно - приблизительно 30, и наиболее предпочтительно - ровно 30 нуклеотидов. CpG может состоять из метилированных и/или неметилированных нуклеотидов, причем указанный по меньшей мере один мотив CpG содержит по меньшей мере один динуклеотид CG, в котором С является неметилированным. CpG может также содержать метилированные и не метилированные участки последовательности, причем указанный по меньшей мере один мотив CpG содержит по меньшей мере один динуклеотид CG, в котором С является неметилированным. В крайне предпочтительном случае CpG имеет отношение к одноцепочечному олигодезоксинуклеотиду, содержащему неметилированный цитозин, после которого с 3'-стороны расположен гуанозин, причем указанный неметилированный цитозин и указанный гуанозин связаны фосфодиэфирной связью. CpG могут содержать аналоги нуклеотидов, например, аналоги, содержащие фосфотиозфирные связи, и могут быть двуцепочечными или одноцепочечными. В общем случае фосфодиэфирные CpG представляют собой CpG типа А, как указано ниже, в то время как фосфотиозфирные стабилизированные CpG представляют собой CpG типа В. Предпочтительные CpG-олигонуклеотиды в контексте настоящего изобретения представляют собой CpG типа А.

CpG типа А. В настоящем документе термин "CpG типа А" или "CpG типа D" относится к олигодезоксинуклеотиду (ОДН), содержащему по меньшей мере один мотив CpG. CpG типа А преимущественно стимулируют активацию Т-клеток и созревание дендритных клеток и могут стимулировать продукцию ИФН-альфа. В CpG типа А нуклеотиды по меньшей мере одного мотива CpG связаны по меньшей мере одной фосфодиэфирной связью. CpG типа А содержат по меньшей мере один мотив CpG с фосфодиэфирной связью, который может быть фланкирован по 5'-концу и/или, предпочтительно, по 3'-концу нуклеотидами, связанными фосфотиозатной связью. Предпочтительно мотив CpG и, предпочтительно, динуклеотид CG и области, непосредственно фланкирующие его, содержащие по меньшей мере один, предпочтительно два нуклеотида, состоят из фосфодиэфирных нуклеотидов. Предпочтительные CpG типа А состоят исключительно из нуклеотидов, соединенных фосфодиэфирными связями (РО). В типичном предпочтительном случае мотив "поли-G" содержит или, в альтернативном случае, состоит из по меньшей мере одного, предпочтительно по меньшей мере трех, по меньшей мере 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 G (молекул гуанозина), наиболее предпочтительно по меньшей мере 10 G. Предпочтительно CpG типа А согласно настоящему изобретению содержит или, в альтернативном случае, состоит из палиндромной последовательности.

Упакованный. Термин "упакованный" в настоящем документе относится к состоянию полианионной макромолекулы или иммуностимулирующих веществ по отношению к коровой частице и VLP, соответственно. Термин "упакованный" в настоящем документе включает связывание, которое может являться ковалентным, например, путем химического присоединения, или нековалентным, например, ионные взаимодействия, гидрофобные взаимодействия, водородные связи и т.д. Данный термин также включает окружение или частичное окружение полианионной макромолекулы. Так, полианионная макромолекула или иммуностимулирующие вещества могут быть окружены VLP при отсутствии фактического связывания, в частности, ковалентного связывания. В предпочтительных вариантах реализации по меньшей мере одна полианионная макромолекула или иммуностимулирующие вещества упакованы в VLP, наиболее предпочтительно - нековалентным образом. В случае, если указанные иммуностимулирующие вещества представляют собой нуклеиновую кислоту, предпочтительно ДНК, термин "упакованный" подразумевает, что указанная нуклеиновая кислота недоступна для нуклеазного гидролиза, предпочтительно недоступна для ДНКазного гидролиза (например, с использованием ДНКазы I или бензоназы), причем указанную доступность анализируют в соответствии с описанием в примерах 11-17 заявки WO2003/024481A2.

Таким образом, в первом аспекте настоящего изобретения предложена композиция для применения в способе профилактики или лечения атопического дерматита собак (АДС) у представителей семейства псовых, предпочтительно домашней собаки, причем эффективное количество указанной композиции вводят указанному животному семейства псовых, предпочтительно указанной домашней собаке, и указанная композиция содержит (а) коровую частицу с по меньшей мере одним первым сайтом присоединения; и (б) по меньшей мере один антиген собачьего интерлейкина-31 (антиген cIL-31) с по меньшей мере одним вторым сайтом присоединения, причем указанный антиген cIL-31 содержит или, предпочтительно, состоит из белка с аминокислотной последовательностью, выбранной из SEQ ID NO: 22, или белка с аминокислотной последовательностью, обладающей по меньшей мере 90%, предпочтительно по меньшей мере 92%, более предпочтительно - по меньшей мере 95%, и еще более предпочтительно - по меньшей мере 98% идентичностью аминокислотной последовательности по отношению к SEQ ID NO: 22; причем компоненты (а) и (б) связаны посредством указанных по меньшей мере одного первого и по меньшей мере одного второго сайта присоединения за счет по меньшей мере одной непептидной кова-

лентной связи.

В предпочтительном варианте реализации указанная коровья частица представляет собой вирусоподобную частицу (VLP), предпочтительно рекомбинантную VLP. В дополнительном предпочтительном варианте реализации указанная VLP представляет собой модифицированную VLP вируса мозаики огурца (CMV), причем указанная модифицированная VLP CMV содержит, состоит или по существу состоит из по меньшей мере одного модифицированного полипептида CMV, причем указанный модифицированный полипептид CMV содержит или, предпочтительно, состоит из (a) полипептида CMV и (b) эпитопа Т-хелпера; причем указанный полипептид CMV содержит или, предпочтительно, состоит из (i) аминокислотной последовательности белка оболочки CMV; или (ii) мутированной аминокислотной последовательности, причем мутируемая аминокислотная последовательность представляет собой аминокислотную последовательность белка оболочки CMV, и указанная мутированная аминокислотная последовательность и указанный белок оболочки CMV демонстрируют идентичность последовательности по меньшей мере 90%, предпочтительно по меньшей мере 95%, более предпочтительно по меньшей мере 98%, и еще более предпочтительно - по меньшей мере 99%. В дополнительном крайне предпочтительном варианте реализации указанный полипептид CMV содержит или, предпочтительно, состоит из (a) аминокислотной последовательности белка оболочки CMV, причем указанная аминокислотная последовательность содержит или, предпочтительно, состоит из SEQ ID NO: 1, или (b) аминокислотной последовательности, обладающей идентичностью последовательности по меньшей мере 90% по отношению к SEQ ID NO: 1; и указанная аминокислотная последовательность, определенная в (a) или (b) данного пункта формулы изобретения, содержит SEQ ID NO: 23; или указанная аминокислотная последовательность, определенная в (a) или (b) данного пункта формулы изобретения, содержит область аминокислотной последовательности, причем указанная область аминокислотной последовательности обладает идентичностью последовательности по меньшей мере 90% по отношению к SEQ ID NO: 23. В дополнительном крайне предпочтительном варианте реализации указанная VLP представляет собой модифицированную VLP вируса мозаики огурца (CMV), причем указанный модифицированный полипептид CMV содержит, предпочтительно-состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 7.

В дополнительном крайне предпочтительном варианте реализации указанный по меньшей мере один антиген cIL-31 содержит или, предпочтительно, состоит из белка с аминокислотной последовательностью, выбранной из: (a) SEQ ID NO: 18; (b) SEQ ID NO: 21; (c) SEQ ID NO: 22; (d) SEQ ID NO: 25-30. В дополнительном крайне предпочтительном варианте реализации указанный по меньшей мере один антиген cIL-31 содержит или, предпочтительно, состоит из белка с аминокислотной последовательностью, выбранной из: (a) SEQ ID NO: 18; (b) SEQ ID NO: 21; (c) SEQ ID NO: 22; (d) SEQ ID NO: 25; или (e) SEQ ID NO: 26. В дополнительном крайне предпочтительном варианте реализации указанный второй сайт присоединения представляет собой сульфгидрильную группу, причем, предпочтительно, указанная сульфгидрильная группа получена в результате реакции указанного антигена cIL-31 с N-сукцинимидил-S-ацетилтиоацетатом (SATA). В дополнительном крайне предпочтительном варианте реализации указанный второй сайт присоединения представляет собой сульфгидрильную группу, причем, предпочтительно, указанная сульфгидрильная группа получена в результате реакции остатка лизина с указанным антигеном cIL-31.

В еще одном аспекте настоящего изобретения предложена композиция для применения в способе профилактики или лечения атопического дерматита собак (АДС) у домашней собаки, причем эффективное количество указанной композиции вводят указанной домашней собаке, и указанная композиция содержит (a) коровью частицу с по меньшей мере одним первым сайтом присоединения, причем указанная коровья частица предпочтительно представляет собой вирусоподобную частицу (VLP), более предпочтительно - рекомбинантную VLP; и (b) по меньшей мере один антиген собачьего интерлейкина-31 (антиген cIL-31) с по меньшей мере одним вторым сайтом присоединения, причем указанный антиген cIL-31 содержит или, предпочтительно, состоит из белка с аминокислотной последовательностью, выбранной из SEQ ID NO: 22, или белка с аминокислотной последовательностью, обладающей по меньшей мере 90%, предпочтительно по меньшей мере 92%, более предпочтительно - по меньшей мере 95%, и еще более предпочтительно - по меньшей мере 98% идентичностью аминокислотной последовательности по отношению к SEQ ID NO: 22; причем компоненты (a) и (b) связаны посредством указанных по меньшей мере одного первого и по меньшей мере одного второго сайта присоединения за счет по меньшей мере одной непептидной ковалентной связи.

В предпочтительном варианте реализации указанная вирусоподобная частица (VLP) происходит от вируса растения. В еще одном предпочтительном варианте реализации указанная VLP является рекомбинантной VLP, и, предпочтительно, указанная рекомбинантная VLP происходит от вируса растения. В еще одном предпочтительном варианте реализации указанная VLP представляет собой VLP вируса мозаики огурца (CMV).

В предпочтительном варианте реализации указанная VLP представляет собой модифицированную VLP, содержащую, по существу состоящую или, в альтернативном случае, состоящую из по меньшей мере одного модифицированного полипептида VLP, причем указанный модифицированный полипептид VLP содержит или, предпочтительно, состоит из (a) полипептида VLP и (b) эпитопа Т-хелпера, причем

указанный полипептид VLP содержит или, предпочтительно, состоит из (i) аминокислотной последовательности белка оболочки вируса, предпочтительно аминокислотной последовательности белка оболочки вируса растения; или (ii) мутированную аминокислотную последовательность, причем мутируемая аминокислотная последовательность представляет собой аминокислотную последовательность указанного белка оболочки вируса, и указанная мутированная аминокислотная последовательность и указанный белок оболочки вируса демонстрируют идентичность последовательности, составляющую по меньшей мере 90%, предпочтительно по меньшей мере 95%, более предпочтительно по меньшей мере 98% и еще более предпочтительно - по меньшей мере 99%.

В предпочтительном варианте реализации указанная VLP представляет собой модифицированную VLP вируса мозаики огурца (CMV), причем указанная модифицированная VLP CMV содержит, состоит или по существу состоит из по меньшей мере одного модифицированного полипептида CMV, причем указанный модифицированный полипептид CMV содержит или, предпочтительно, состоит из (a) полипептида CMV и (b) эпитопа Т-хелпера; причем указанный полипептид CMV содержит или, предпочтительно, состоит из (i) аминокислотной последовательности белка оболочки CMV; или (ii) мутированной аминокислотной последовательности, причем мутируемая аминокислотная последовательность представляет собой аминокислотную последовательность белка оболочки CMV, и указанная мутированная аминокислотная последовательность и указанный белок оболочки CMV демонстрируют идентичность последовательности по меньшей мере 90%, предпочтительно по меньшей мере 95%, более предпочтительно по меньшей мере 98%, и еще более предпочтительно - по меньшей мере 99%.

В предпочтительном варианте реализации указанный полипептид CMV содержит, предпочтительно состоит из аминокислотной последовательности белка оболочки CMV. В еще одном предпочтительном варианте реализации указанный полипептид CMV содержит, предпочтительно состоит из мутированной аминокислотной последовательности, причем мутируемая аминокислотная последовательность представляет собой аминокислотную последовательность белка оболочки CMV, и указанная мутированная аминокислотная последовательность и указанный белок оболочки CMV демонстрируют идентичность последовательности, составляющую по меньшей мере 90%, предпочтительно по меньшей мере 95%, более предпочтительно по меньшей мере 98%, и еще более предпочтительно - по меньшей мере 99%. В типичном предпочтительном случае указанная мутированная аминокислотная последовательность и указанная мутируемая аминокислотная последовательность отличаются по меньшей мере не один и не более чем на 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3 или 2 аминокислотных остатка, причем предпочтительно данные различия выбраны из (i) инсерции, (ii) делеции, (iii) аминокислотной замены и (iv) комбинации (i)-(iii).

В еще одном предпочтительном варианте реализации указанный полипептид CMV содержит или, предпочтительно, состоит из (i) (a) аминокислотной последовательности белка оболочки CMV, причем указанная аминокислотная последовательность содержит или, предпочтительно, состоит из SEQ ID NO: 1, или (b) аминокислотной последовательности, обладающей идентичностью последовательности, составляющей по меньшей мере 75%, предпочтительно по меньшей мере 80%, более предпочтительно по меньшей мере 85%, более предпочтительно - по меньшей мере 90%, еще более предпочтительно - по меньшей мере 95%, еще более предпочтительно - по меньшей мере 98%, и еще более предпочтительно - по меньшей мере 99% по отношению к SEQ ID NO: 1; или (ii) мутированной аминокислотной последовательности, причем указанная мутируемая аминокислотная последовательность представляет собой указанную аминокислотную последовательность, определенную в (i) данного пункта формулы изобретения, причем указанная мутированная аминокислотная последовательность и указанная мутируемая аминокислотная последовательность демонстрируют идентичность последовательности, составляющую по меньшей мере 95%, предпочтительно по меньшей мере 98%, и более предпочтительно по меньшей мере 99%.

В еще одном предпочтительном варианте реализации указанный полипептид CMV содержит или, предпочтительно, состоит из (a) аминокислотной последовательности белка оболочки CMV, причем указанная аминокислотная последовательность содержит или, предпочтительно, состоит из SEQ ID NO: 1, или (b) аминокислотной последовательности, обладающей идентичностью последовательности, составляющей по меньшей мере 75%, предпочтительно по меньшей мере 80%, более предпочтительно по меньшей мере 85%, более предпочтительно - по меньшей мере 90%, еще более предпочтительно - по меньшей мере 95%, еще более предпочтительно - по меньшей мере 98%, и еще более предпочтительно - по меньшей мере 99% по отношению к SEQ ID NO: 1.

В еще одном предпочтительном варианте реализации указанный полипептид CMV содержит или, предпочтительно, состоит из (i) (a) аминокислотной последовательности белка оболочки CMV, причем указанная аминокислотная последовательность содержит или, предпочтительно, состоит из SEQ ID NO: 23, или (b) аминокислотной последовательности белка оболочки CMV, содержащей область аминокислотной последовательности, причем указанная область аминокислотной последовательности обладает идентичностью последовательности, составляющей по меньшей мере 75%, предпочтительно по меньшей мере 80%, более предпочтительно по меньшей мере 85%, более предпочтительно - по меньшей мере 90%, еще более предпочтительно - по меньшей мере 95%, еще более предпочтительно - по меньшей мере 98%, и еще более предпочтительно - по меньшей мере 99% по отношению к SEQ ID NO: 23; или (ii) му-

тированной аминокислотной последовательности, причем указанная мутируемая аминокислотная последовательность представляет собой указанную аминокислотную последовательность, определенную в (i) данного пункта формулы изобретения, причем указанная мутированная аминокислотная последовательность и указанная мутируемая аминокислотная последовательность демонстрируют идентичность последовательности, составляющую по меньшей мере 95%, предпочтительно по меньшей мере 98%, и более предпочтительно - по меньшей мере 99%.

В дополнительном предпочтительном варианте реализации указанный полипептид CMV содержит или, предпочтительно, состоит из (а) аминокислотной последовательности белка оболочки CMV, причем указанная аминокислотная последовательность содержит SEQ ID NO: 23, или (b) аминокислотной последовательности белка оболочки CMV, содержащей область аминокислотной последовательности, причем указанная область аминокислотной последовательности обладает идентичностью последовательности, составляющей по меньшей мере 75%, предпочтительно по меньшей мере 80%, более предпочтительно по меньшей мере 85%, более предпочтительно - по меньшей мере 90%, еще более предпочтительно - по меньшей мере 95%, еще более предпочтительно - по меньшей мере 98%, и еще более предпочтительно - по меньшей мере 99% по отношению к SEQ ID NO: 23.

В еще одном предпочтительном варианте реализации указанный полипептид CMV содержит или, предпочтительно, состоит из (i) (a) аминокислотной последовательности белка оболочки CMV, причем указанная аминокислотная последовательность содержит или, предпочтительно, состоит из SEQ ID NO: 1, или (b) аминокислотной последовательности, обладающей идентичностью последовательности, составляющей по меньшей мере 75%, предпочтительно по меньшей мере 80%, более предпочтительно по меньшей мере 85%, более предпочтительно - по меньшей мере 90%, еще более предпочтительно - по меньшей мере 95%, еще более предпочтительно - по меньшей мере 98%, и еще более предпочтительно - по меньшей мере 99% по отношению к SEQ ID NO: 1; причем указанная аминокислотная последовательность, определенная в (a) или (b) данного пункта формулы изобретения, содержит SEQ ID NO: 23; или указанная аминокислотная последовательность, определенная в (a) или (b) данного пункта формулы изобретения, содержит область аминокислотной последовательности, причем указанная область аминокислотной последовательности обладает идентичностью последовательности, составляющей по меньшей мере 75%, предпочтительно по меньшей мере 80%, более предпочтительно по меньшей мере 85%, более предпочтительно - по меньшей мере 90%, еще более предпочтительно - по меньшей мере 95%, еще более предпочтительно - по меньшей мере 98%, и еще более предпочтительно - по меньшей мере 99% по отношению к SEQ ID NO: 23; или (ii) мутированной аминокислотной последовательности, причем указанная мутлируемая аминокислотная последовательность представляет собой указанную аминокислотную последовательность, определенную в (i) данного пункта формулы изобретения, причем указанная мутированная аминокислотная последовательность и указанная мутлируемая аминокислотная последовательность демонстрируют идентичность последовательности, составляющую по меньшей мере 98%, предпочтительно - по меньшей мере 99%.

В еще одном предпочтительном варианте реализации указанный полипептид CMV содержит или, предпочтительно, состоит из (а) аминокислотной последовательности белка оболочки CMV, причем указанная аминокислотная последовательность содержит или, предпочтительно, состоит из SEQ ID NO: 1, или (b) аминокислотной последовательности, обладающей идентичностью последовательности по меньшей мере 90% по отношению к SEQ ID NO: 1; и указанная аминокислотная последовательность, определенная в (а) или (b) данного пункта формулы изобретения, содержит SEQ ID NO: 23; или указанная аминокислотная последовательность, определенная в (а) или (b) данного пункта формулы изобретения, содержит область аминокислотной последовательности, причем указанная область аминокислотной последовательности обладает идентичностью последовательности по меньшей мере 90% по отношению к SEQ ID NO: 23.

В еще одном предпочтительном варианте реализации указанный эпитоп Т-хелпера замещает N-концевую область указанного полипептида CMV. В еще одном предпочтительном варианте реализации количество аминокислот в указанной замещенной N-концевой области равно или менее количества аминокислот, из которого состоит указанный эпитоп Т-хелпера.

В дополнительном крайне предпочтительном варианте реализации указанный эпитоп Т-хелпера замещает N-концевую область указанного полипептида CMV, причем количество аминокислот в указанной замещенной N-концевой области равно или менее количества аминокислот, из которого состоит указанный эпитоп Т-хелпера. В типичном предпочтительном случае указанная замещаемая N-концевая область указанного полипептида CMV состоит из 5-15 последовательных аминокислот, предпочтительно из 9-14 последовательных аминокислот, более предпочтительно - из 11-13 последовательных аминокислот.

В дополнительном крайне предпочтительном варианте реализации указанная N-концевая область указанного полипептида CMV соответствует 2-12 аминокислотам SEQ ID NO: 1.

В еще одном крайне предпочтительном варианте реализации указанный эпитоп Т-хелпера представляет собой универсальный эпитоп Т-хелпера. В еще одном предпочтительном варианте реализации указанный эпитоп Т-хелпера состоит из не более чем 20 аминокислот.

В крайне предпочтительном варианте реализации указанный эпитоп Th-клетки представляет собой последовательность PADRE. В дополнительном крайне предпочтительном варианте реализации указанный эпитоп Th-клетки содержит, предпочтительно состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5. В еще одном крайне предпочтительном варианте реализации указанный эпитоп Th-клетки представляет собой последовательность PADRE, причем указанный эпитоп Th-клетки содержит, предпочтительно состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5.

В еще одном предпочтительном варианте реализации указанный эпитоп Т-хелпера получен из вакцины для медицинского применения. В крайне предпочтительном варианте реализации указанный эпитоп Th-клетки происходит от столбнячного токсина. В дополнительном крайне предпочтительном варианте реализации указанный эпитоп Th-клетки содержит, предпочтительно -состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4. В еще одном крайне предпочтительном варианте реализации указанный эпитоп Th-клетки происходит от столбнячного токсина, причем указанный эпитоп Th-клетки содержит, предпочтительно состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4.

В крайне предпочтительном варианте реализации указанный эпитоп Th-клетки представляет собой последовательность PADRE, причем указанный эпитоп Th-клетки содержит, предпочтительно состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5; или указанный эпитоп Th-клетки происходит от столбнячного токсина, причем указанный эпитоп Th-клетки содержит, предпочтительно состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4.

В крайне предпочтительном варианте реализации указанный полипептид CMV содержит или, предпочтительно, состоит из (а) аминокислотной последовательности белка оболочки CMV, причем указанная аминокислотная последовательность содержит или, предпочтительно, состоит из SEQ ID NO: 1, или (b) аминокислотной последовательности, обладающей идентичностью последовательности по меньшей мере 95% по отношению к SEQ ID NO: 1; причем указанная аминокислотная последовательность содержит SEQ ID NO: 23; и указанный эпитоп Т-хелпера замещает N-концевую область указанного полипептида CMV, причем указанная замещенная N-концевая область указанного полипептида CMV состоит из 11-13 последовательных аминокислот, предпочтительно - 11 последовательных аминокислот, и, более предпочтительно, указанная N-концевая область указанного полипептида CMV соответствует 2-12 аминокислотам SEQ ID NO: 1.

В еще одном крайне предпочтительном варианте реализации указанный модифицированный полипептид CMV содержит, предпочтительно состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 6. В еще одном крайне предпочтительном варианте реализации указанный модифицированный полипептид CMV содержит, предпочтительно состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 7. Применение композиции по любому из пп.6-8, отличающееся тем, что указанный модифицированный полипептид CMV содержит, предпочтительно состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 7.

В крайне предпочтительном варианте реализации указанный первый сайт присоединения и указанный второй сайт присоединения связаны посредством по меньшей мере одной ковалентной непептидной связи. В еще одном крайне предпочтительном варианте реализации указанный первый сайт присоединения содержит или, предпочтительно, представляет собой аминокислотную группу, предпочтительно - аминокислотную группу лизина. В дополнительном крайне предпочтительном варианте реализации указанный второй сайт присоединения содержит или, предпочтительно, представляет собой сульфгидрильную группу, предпочтительно - сульфгидрильную группу цистеина.

В крайне предпочтительном варианте реализации по меньшей мере один первый сайт присоединения представляет собой аминокислотную группу, предпочтительно - аминокислотную группу остатка лизина, и по меньшей мере один второй сайт присоединения представляет собой сульфгидрильную группу, предпочтительно - сульфгидрильную группу остатка цистеина или сульфгидрильную группу, химически присоединенную к антигену cIL-31. В дополнительном предпочтительном варианте реализации лишь один из указанных вторых сайтов присоединения связывается с указанным первым сайтом присоединения посредством по меньшей мере одной непептидной ковалентной связи, что приводит к единому и однородному типу связывания указанного антигена cIL-31 с указанной модифицированной вирусоподобной частицей, причем указанный лишь один второй сайт присоединения, связывающийся с указанным первым сайтом присоединения, представляет собой сульфгидрильную группу, и указанный антиген cIL-31 и указанная модифицированная вирусоподобная частица взаимодействуют посредством этого связывания с образованием упорядоченной и повторяющейся антигенной матрицы, т.е. упорядоченной и повторяющейся матрицы антигенов cIL-31.

В одном предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения антиген cIL-31 связан с модифицированной VLP посредством химического перекрестного связывания, в типичном предпочтительном случае - с использованием гетеробифункционального перекрестного линкера. В предпочтительных вариантах реализации гетеробифункциональный перекрестный линкер содержит функциональную группу, которая может реагировать с предпочтительными первыми сайтами присоединения, предпочтительно - с аминокислотной группой, более предпочтительно - с аминокислотными группами остатка(ов) лизина модифицированной VLP, и дополнительную функциональную группу, способную реагировать с предпочтительным вто-

рым сайтом присоединения, т.е. сульфгидрильной группой, предпочтительно - остатка(ов) цистеина, содержащихся в или искусственно добавленных к антигену cIL-31, и, необязательно, активируемой для реакции посредством восстановления. В данной области техники известно несколько гетеробифункциональных перекрестных линкеров. Они включают предпочтительные перекрестные линкеры SMPH (Pierce), сульфо-MBS, сульфо-EMCS, сульфо-GMBS, сульфо-SIAB, сульфо-SMPB, сульфо-SMCC, сульфо-KMUS SVSB, SIA и другие перекрестные линкеры, например, доступные в компании Pierce Chemical Company, и содержащие одну функциональную группу, реакционноспособную по отношению к аминогруппам, и одну функциональную группу, реакционноспособную по отношению к сульфгидрильным группам. Все вышеупомянутые перекрестные линкеры приводят к образованию амидной связи после реакции с аминогруппой и тиоэфирного связывания с сульфгидрильными группами. Еще один класс перекрестных линкеров, подходящих для реализации настоящего изобретения, характеризуется внедрением дисульфидной связи между антигеном cIL-31 и модифицированной VLP при присоединении. Предпочтительные перекрестные линкеры, принадлежащие к этому классу, включают, например, SPDP и сульфо-LC-SPDP (Pierce). В крайне предпочтительном варианте реализации указанный гетеробифункциональный перекрестный линкер представляет собой SMPH.

Связывание антигена cIL-31 с модифицированной VLP с использованием гетеробифункционального перекрестного линкера в соответствии с предпочтительными способами, описанными выше, обеспечивает присоединение антигена cIL-31 к модифицированной VLP в специфической ориентации. Другие способы связывания антигена cIL-31 с модифицированной VLP включают способы, в которых антиген cIL-31 перекрестно связывается с модифицированной VLP с использованием карбодиимида EDC и NHS. Кроме того, антиген cIL-31 можно вначале тиолировать посредством реакции, например, с SATA, SATP или иминтиолоном. Антиген cIL-31, при необходимости - после снятия защиты, затем можно присоединить к модифицированной VLP следующим образом. После отделения избыточного тиолирующего реагента антиген cIL-31 взаимодействует с модифицированной VLP, ранее активированной гетеробифункциональным перекрестным линкером, содержащим реакционноспособную группу цистеина, и, следовательно, содержащей по меньшей мере одну или несколько открытых функциональных групп, реакционноспособных по отношению к остаткам цистеина, с которыми может взаимодействовать тиолированный антиген cIL-31, как описано выше. В реакционную смесь необязательно включают небольшие количества восстановителя. В дальнейших способах антиген cIL-31 присоединяют к модифицированной VLP с использованием гомобифункционального перекрестного линкера, например, глутаральдегида, DSG, BM[PEO]4, BS3, (Pierce) или других известных гомобифункциональных перекрестных линкеров с функциональными группами, реакционноспособными по отношению к аминогруппам или карбоксильным группам модифицированной VLP.

В дополнительном предпочтительном варианте реализации указанная композиция дополнительно содержит по меньшей мере одно иммуностимулирующее вещество. В крайне предпочтительном варианте реализации указанное иммуностимулирующее вещество упаковано в модифицированную VLP согласно настоящему изобретению. В еще одном предпочтительном варианте реализации иммуностимулирующее вещество смешано с модифицированной VLP согласно настоящему изобретению. Иммуностимулирующие вещества, подходящие для настоящего изобретения, в целом известны в данной области техники и описаны, в числе прочего, в WO2003/024481A2.

В еще одном варианте реализации настоящего изобретения указанное иммуностимулирующее вещество состоит из ДНК или РНК неэукариотического происхождения. В еще одном предпочтительном варианте реализации указанное иммуностимулирующее вещество выбрано из группы, состоящей из: (a) иммуностимулирующей нуклеиновой кислоты; (b) пептидогликана; (c) липополисахарида; (d) липотейхоевой кислоты; (e) имидазохинолинового соединения; (f) флагеллина; (g) липопотеина; и (h) любых смесей по меньшей мере одного вещества (a) - (g). В еще одном предпочтительном варианте реализации указанное иммуностимулирующее вещество представляет собой иммуностимулирующую нуклеиновую кислоту, причем указанная нуклеиновая кислота выбрана из группы, состоящей из: (a) рибонуклеиновых кислот; (b) дезоксирибонуклеиновых кислот; (c) химерных нуклеиновых кислот; и (d) любой смеси (a), (b) и/или (c). В дополнительном предпочтительном варианте реализации указанная иммуностимулирующая нуклеиновая кислота представляет собой рибонуклеиновую кислоту, причем указанная рибонуклеиновая кислота представляет собой РНК бактериального происхождения. В дополнительном предпочтительном варианте реализации указанная иммуностимулирующая нуклеиновая кислота представляет собой поли-(LC) или его производное. В дополнительном предпочтительном варианте реализации указанная иммуностимулирующая нуклеиновая кислота представляет собой дезоксирибонуклеиновую кислоту, причем указанная дезоксирибонуклеиновая кислота представляет собой олигонуклеотид, содержащий неметилованный CpG.

В крайне предпочтительном варианте реализации указанное иммуностимулирующее вещество представляет собой олигонуклеотид, содержащий неметилованный CpG. В дополнительном предпочтительном варианте реализации указанный олигонуклеотид, содержащий неметилованный CpG, представляет собой CpG типа A. В дополнительном предпочтительном варианте реализации указанный CpG типа A содержит последовательность GACGATCGTC (SEQ ID NO: 24). В дополнительном предпочтительном

тельном варианте реализации указанная палиндромная последовательность фланкирована по 5'-концу и 3'-концу единицами гуанозина. В дополнительном предпочтительном варианте реализации указанная палиндромная последовательность фланкирована по 5'-концу по меньшей мере 3 и не более чем 15 единицами гуанозина и по 3'-концу по меньшей мере 3 и не более чем 15 единицами гуанозина.

В еще одном предпочтительном варианте реализации указанное иммуностимулирующее вещество представляет собой олигонуклеотид, содержащий неметилированный CpG, причем предпочтительно указанный олигонуклеотид, содержащий неметилированный CpG, содержит палиндромную последовательность, и, более предпочтительно, мотив CpG указанного олигонуклеотида, содержащего неметилированный CpG, входит в состав палиндромной последовательности, и, более предпочтительно, указанная палиндромная последовательность представляет собой GACGATCGTC (SEQ ID NO: 24).

В крайне предпочтительном варианте реализации указанный по меньшей мере один антиген cIL-31 связан посредством сульфгидрильной группы с указанной коровой частицей, предпочтительно с указанной VLP, более предпочтительно - с указанной модифицированной VLP CMV, причем, предпочтительно, указанная сульфгидрильная группа содержится в указанном втором сайте присоединения и указанная сульфгидрильная группа не встречается в указанном антигене cIL-31 в естественных условиях, и, предпочтительно, указанная сульфгидрильная группа получена в результате реакции указанного антигена cIL-31 с N-сукцинимидил-S-ацетилтиоацетатом (SATA), N-сукцинимидил-S-ацетилтиопропионатом (SATP) или иминтиолоном, более предпочтительно - указанная сульфгидрильная группа получена в результате реакции антигена cIL-31 с N-сукцинимидил-S-ацетилтиоацетатом (SATA). В дополнительном крайне предпочтительном варианте реализации указанный второй сайт присоединения представляет собой сульфгидрильную группу, причем, предпочтительно, указанная сульфгидрильная группа получена в результате реакции остатка лизина с указанным антигеном cIL-31.

В других предпочтительных вариантах реализации настоящего изобретения антиген cIL-31 присоединен посредством остатка цистеина, добавленного к N-концу или C-концу, или природного остатка цистеина в составе антигена cIL-31, к остаткам лизина модифицированной вирусоподобной частицы. В предпочтительном варианте реализации композиция согласно настоящему изобретению дополнительно содержит линкер, причем указанный линкер соединяет указанный антиген cIL-31 со вторым сайтом присоединения и, предпочтительно, указанный линкер содержит или, в альтернативном случае, состоит из указанного второго сайта присоединения.

В предпочтительном варианте реализации указанный антиген cIL-31 содержит или, предпочтительно, состоит из белка с аминокислотной последовательностью, обладающей по меньшей мере 90% идентичностью аминокислотной последовательности по отношению к SEQ ID NO: 22. В еще одном предпочтительном варианте реализации указанный антиген cIL-31 содержит, или, предпочтительно, состоит из белка с аминокислотной последовательностью, обладающей по меньшей мере 92% идентичностью аминокислотной последовательности по отношению к SEQ ID NO: 22. В дополнительном предпочтительном варианте реализации указанный антиген cIL-31 содержит или, предпочтительно, состоит из белка с аминокислотной последовательностью, обладающей по меньшей мере 95% идентичностью аминокислотной последовательности по отношению к SEQ ID NO: 22. В крайне предпочтительном варианте реализации указанный антиген cIL-31 содержит или, предпочтительно - состоит из белка с аминокислотной последовательностью, обладающей по меньшей мере 98% идентичностью аминокислотной последовательности по отношению к SEQ ID NO: 22. В дополнительном крайне предпочтительном варианте реализации указанный антиген содержит или, предпочтительно, состоит из белка с аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 22. В дополнительном крайне предпочтительном варианте реализации указанный по меньшей мере один антиген cIL-31 содержит или, предпочтительно, состоит из белка с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 18. В дополнительном крайне предпочтительном варианте реализации указанный по меньшей мере один антиген cIL-31 содержит или, предпочтительно, состоит из белка с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 21. В дополнительном крайне предпочтительном варианте реализации указанный второй сайт присоединения представляет собой сульфгидрильную группу, причем, предпочтительно, указанная сульфгидрильная группа получена в результате реакции указанного антигена cIL-31 с N-сукцинимидил-S-ацетилтиоацетатом (SATA). В дополнительном крайне предпочтительном варианте реализации указанный второй сайт присоединения представляет собой сульфгидрильную группу, причем, предпочтительно, указанная сульфгидрильная группа получена в результате реакции остатка лизина с указанным антигеном cIL-31.

В дополнительном аспекте настоящего изобретения предложена композиция, содержащая (a) вирусоподобную частицу (VLP) с по меньшей мере одним первым сайтом присоединения; (b) по меньшей мере один антиген собачьего интерлейкина-31 (антиген cIL-31) с по меньшей мере одним вторым сайтом присоединения, причем указанный антиген cIL-31 содержит или, предпочтительно, состоит из белка с аминокислотной последовательностью, выбранной из SEQ ID NO: 22, или белка с аминокислотной последовательностью, обладающей по меньшей мере 90%, предпочтительно по меньшей мере 92%, еще более предпочтительно - по меньшей мере 95%, и еще более предпочтительно - по меньшей мере 98% идентичностью аминокислотной последовательности по отношению к SEQ ID NO: 22; и, более предпочтительно, указанный антиген содержит или, предпочтительно, состоит из белка с аминокислотной после-

довательностью SEQ ID NO: 22; причем компоненты (a) и (b) связаны посредством указанных по меньшей мере одного первого и по меньшей мере одного второго сайта присоединения за счет по меньшей мере одной непептидной ковалентной связи.

В дополнительном крайне предпочтительном варианте реализации указанная VLP представляет собой модифицированную VLP вируса мозаики огурца (CMV), причем указанный модифицированный полипептид CMV содержит, предпочтительно состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 7.

В дополнительном крайне предпочтительном варианте реализации указанный по меньшей мере один антиген cIL-31 содержит или, предпочтительно, состоит из белка с аминокислотной последовательностью, выбранной из: (a) SEQ ID NO: 18; (b) SEQ ID NO: 21; (c) SEQ ID NO: 22; (d) SEQ ID NO: 25-30. В дополнительном крайне предпочтительном варианте реализации указанный по меньшей мере один антиген cIL-31 содержит или, предпочтительно, состоит из белка с аминокислотной последовательностью, выбранной из: (a) SEQ ID NO: 18; (b) SEQ ID NO: 21; (c) SEQ ID NO: 22; (d) SEQ ID NO: 25; или (e) SEQ ID NO: 26. В дополнительном предпочтительном варианте реализации указанный антиген cIL-31 содержит или, предпочтительно, состоит из белка с аминокислотной последовательностью, обладающей по меньшей мере 95% идентичностью аминокислотной последовательности по отношению к SEQ ID NO: 22. В крайне предпочтительном варианте реализации указанный антиген cIL-31 содержит или, предпочтительно - состоит из белка с аминокислотной последовательностью, обладающей по меньшей мере 98% идентичностью аминокислотной последовательности по отношению к SEQ ID NO: 22. В дополнительном крайне предпочтительном варианте реализации указанный антиген содержит или, предпочтительно, состоит из белка с аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 22. В дополнительном крайне предпочтительном варианте реализации указанный по меньшей мере один антиген cIL-31 содержит или, предпочтительно, состоит из белка с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 18. В дополнительном крайне предпочтительном варианте реализации указанный по меньшей мере один антиген cIL-31 содержит или, предпочтительно, состоит из белка с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 21. В дополнительном крайне предпочтительном варианте реализации указанный второй сайт присоединения представляет собой сульфгидрильную группу, причем, предпочтительно, указанная сульфгидрильная группа получена в результате реакции указанного антигена cIL-31 с N-сукцинимидил-S-ацетилтиоацетатом (SATA). В дополнительном крайне предпочтительном варианте реализации указанный второй сайт присоединения представляет собой сульфгидрильную группу, причем, предпочтительно, указанная сульфгидрильная группа получена в результате реакции остатка лизина с указанным антигеном cIL-31.

В еще одном аспекте настоящего изобретения предложен способ профилактики или лечения атопического дерматита собак (АДС) у представителей семейства псовых, предпочтительно домашней собаки, включающий введение эффективного количества композиции указанному животному семейства псовых, предпочтительно указанной домашней собаке, и указанная композиция содержит (a) коровую частицу с по меньшей мере одним первым сайтом присоединения; и (b) по меньшей мере один антиген собачьего интерлейкина-31 (антиген cIL-31) с по меньшей мере одним вторым сайтом присоединения, причем указанный антиген cIL-31 содержит или, предпочтительно, состоит из белка с аминокислотной последовательностью, выбранной из SEQ ID NO: 22, или белка с аминокислотной последовательностью, обладающей по меньшей мере 90%, предпочтительно по меньшей мере 92%, более предпочтительно - по меньшей мере 95%, и еще более предпочтительно - по меньшей мере 98% идентичностью аминокислотной последовательности по отношению к SEQ ID NO: 22; причем компоненты (a) и (b) связаны посредством указанных по меньшей мере одного первого и по меньшей мере одного второго сайта присоединения за счет по меньшей мере одной непептидной ковалентной связи, причем, предпочтительно, указанный способ или указанная композиция дополнительно задана согласно описанию в настоящем документе.

В еще одном аспекте настоящего изобретения предложено применение композиции, содержащей (a) коровую частицу с по меньшей мере одним первым сайтом присоединения; и (b) по меньшей мере один антиген собачьего интерлейкина-31 (антиген cIL-31) с по меньшей мере одним вторым сайтом присоединения, причем указанный антиген cIL-31 содержит или, предпочтительно, состоит из белка с аминокислотной последовательностью, выбранной из SEQ ID NO: 22, или белка с аминокислотной последовательностью, обладающей по меньшей мере 90%, предпочтительно по меньшей мере 92%, более предпочтительно - по меньшей мере 95%, и еще более предпочтительно - по меньшей мере 98% идентичностью аминокислотной последовательности по отношению к SEQ ID NO: 22; причем компоненты (a) и (b) связаны посредством указанных по меньшей мере одного первого и по меньшей мере одного второго сайта присоединения за счет по меньшей мере одной непептидной ковалентной связи, для производства медикамента для профилактики или лечения атопического дерматита собак (АДС) у животных семейства псовых, предпочтительно домашней собаки, причем эффективное количество указанной композиции вводят указанному животному семейства псовых, предпочтительно домашней собаке, причем, предпочтительно, указанный способ или указанная композиция дополнительно задана согласно описанию в настоящем документе.

Примеры

Пример 1.

Выделение и клонирование белка оболочки (CP) вируса мозаики огурца (CMV).

Общую РНК из листьев лилии, зараженной CMV, выделяли с использованием реагента TRI (Sigma, Сент-Луис, США) в соответствии с инструкциями производителя. Для синтеза кДНК использовали набор для ОТ-ПЦР OneStep RT-PCR (Qiagen, Венло, Нидерланды). Для амплификации гена CP CMV выбрали последовательности праймеров после анализа последовательностей CMV из GenBank: CMcpF (CACCATGGACAAATCTGAATCAACCACTGCTGGT) (SEQ ID NO: 8) и CMcpR (CAAAGCTTATCAAACCTGGGAGCACCCAGATGTGGGA) (SEQ ID NO: 9); сайты NcoI и HindIII подчеркнуты. Соответствующие продукты ПЦР клонировали в векторе pTZ57R/T (Fermentas, Вильнюс, Литва). Клетки E. coli XL1-Blue использовали в качестве хозяина для клонирования и амплификации плазмиды. Во избежание выбора клонов, содержащих ошибки ПЦР, отдельные клоны плазмиды pTZ57, содержащие ген CP, секвенировали с использованием набора для циклического секвенирования BigDye и генетического анализатора ABI Prism 3100 (Applied Biosystems, Карлсбад, США). После секвенирования кДНК гена CP CMV без ошибок последовательности (SEQ ID NO: 10), кодирующую белок оболочки CMV SEQ ID NO: 1, субклонировали в сайты NcoI/HindIII экспрессирующего вектора pET28a(+) (Novagen, Сан-Диего, США), получая экспрессирующую плазмиду pET-CMVwt (фиг. 1).

Пример 2.

Экспрессия CP SEQ ID NO: 1 в E.coli приводит к получению VLP CMV.

Для получения VLP CMV клетки E. coli C2566 (New England Biolabs, Ипсвич, США) трансформировали плазмидой pET-CMVwt, содержащей ген CP CMV. После выбора клонов с максимальным уровнем экспрессии белка-мишени культуры E. coli выращивали в среде 2xTY, содержащей канамицин (25 мг/л) на качалке (200 об/мин; Infors, Боттминген, Швейцария) при 30°C до оптической плотности OD600, равной 0,8-1,0. Затем клетки индуцировали 0,2 мМ ИПТГ и в среду добавляли 5 мМ MgCl₂. Инкубирование продолжали на качалке при 20°C в течение 18 ч. Полученную биомассу собирали центрифугированием при небольшой скорости и замораживали при -20°C. После размораживания на льду клетки суспендировали в буфере, содержащем 50 мМ цитрата натрия, 5 мМ бората натрия, 5 мМ ЭДТА, 5 мМ меркаптоэтанол (pH 9,0, буфер А) и разрушали путем обработки ультразвуком. Нерастворимые белки и фрагменты клеток удаляли центрифугированием (13000 об/мин, 30 мин при 5°C). Растворимый белок CP CMV в просветленном лизате осаждали с использованием насыщенного раствора сульфата аммония (1:1, об/об) в течение ночи при +4°C. Осажденные белки солиubilизировали в том же буфере А (без меркаптоэтанол) в течение 4 ч при +4°C. Нерастворимые белки удаляли центрифугированием при небольшой скорости (13000 об/мин, 15 мин при 4°C). Раствор, содержащий растворимый белок CP CMV, отделяли от клеточных белков ультрацентрифугированием (ротатор SW28, Beckman, Пало Альто, США; при 25000 об/мин, 6 ч, 5°C) в градиенте сахарозы (20-60% раствор сахарозы в буфере А, без меркаптоэтанол, с добавлением 0,5% тритона X-100). Градиент разделяли на шесть фракций, начиная с нижней части градиента, фракции анализировали электрофорезом в ДСН-ПААГ (данные не показаны). Фракции № 2 и № 3, содержавшие рекомбинантный CP CMV, объединяли и диализовали против 200 объемов буфера (5 мМ бората натрия, 2 мМ ЭДТА, pH 9,0) для удаления сахарозы и тритона X-100. После диализа раствор CP CMV стерилизовали фильтрованием через 0,2-мкм фильтр. Затем CP CMV концентрировали ультрацентрифугированием с использованием ротора Type70 (Beckman, Пало Альто, США) через "подушку" 20% сахарозы в стерильных условиях (50000 об/мин, 4 ч, +5°C). Концентрацию очищенного CMVwt оценивали с помощью флуориметра QuBit в соответствии с рекомендациями производителя (Invitrogen, Юджин, США). Концентрированные растворы VLP (прибл. 3 мг/мл) хранили при +4°C в буфере с 5 мМ боратом натрия, 2 мМ ЭДТА (pH 9,0). Все этапы экспрессии и очистки VLP отслеживали с помощью электрофореза в ДСН-ПААГ с использованием 12,5% гелей.

Белок оболочки CMV можно успешно экспрессировать в клетках E.coli и получить его значительную часть в растворимой фракции. Кроме того, эти белки находятся непосредственно в клеточных экстрактах E.coli в виде изомерных VLP, что продемонстрировано анализом в градиенте сахарозы (фиг. 2А), динамическим светорассеянием и электронно-микроскопическим анализом (фиг. 2В).

Пример 3.

Клонирование модифицированного белка оболочки CMV, содержащего эпитоп столбнячного анатоксина (CMV-Ntt830).

В целях замещения исходных аминокислот на N-конце CP CMV согласно SEQ ID NO: 1 кодирующей последовательностью эпитопа столбнячного анатоксина использовали плазмиду pET-CMVwt для ПЦР-амплификации и мутагенеза. Сайт SalI, расположенный в гене CMVwt (фиг. 1), использовали для клонирования соответствующих продуктов ПЦР.

Для внедрения кодирующей последовательности эпитопа столбнячного анатоксина в ген CMVwt использовали двухэтапный ПЦР-мутагенез. Для первого этапа амплификации использовали следующие праймеры: pET-220 (AGCACCGCCGCGCAAGGAA (SEQ ID NO: 11) - выше полилинкера, амплифицируемая область содержала сайт BglII) и CMV-tt83-1R (ATTTGGAGTTGGCCTTAATA-TACTGGCCCATGGTATATCTCCTTCTTAAAGT) (SEQ ID NO: 12). Для второго раунда продукт ПЦР,

полученный при первой амплификации, разбавляли в соотношении 1:50 и повторно амплифицировали с использованием праймеров pET-220 (SEQ ID NO: 11) и CMV-tt83Sal-R2 (GACG-TCGACGCTCGGTAATCCCGATAAATTTGGAGTTGGCCTTAATATACTG) (SEQ ID NO: 13). Полученный продукт ПЦР (кДНК SEQ ID NO: 14, кодирующую CMV-Ntt830 согласно SEQ ID NO: 6) субклонировали в сайты BglIII/SalI плазмиды pET-CMVwt. Нужный клон идентифицировали секвенированием и обозначили как pET-CMV-Ntt830.

Пример 4.

Экспрессия CMV-Ntt830 в *E.coli* приводит к получению модифицированных VLP CMV.

Для - получения VLP CMV-Ntt830 клетки *E. coli* C2566 (New England Biolabs, Ипсвич, США) трансформировали плазмидой pET-CMVwt-Ntt830, содержащей ген CMV-Ntt830. После выбора клонов с максимальным уровнем экспрессии белка-мишени культуры *E. coli* выращивали в среде 2xTY, содержащей канамицин (25 мг/л) на качалке (200 об/мин; Infors, Боттминген, Швейцария) при 30°C до оптической плотности OD600, равной 0,8-1,0. Затем клетки индуцировали 0,2 мМ ИПТГ и в среду добавляли 5 мМ MgCl₂. Инкубирование продолжали на качалке при 20°C в течение 18 ч. Полученную биомассу собирали центрифугированием при небольшой скорости и замораживали при -20°C. После размораживания на льду клетки суспендировали в буфере, содержащем 50 мМ цитрата натрия, 5 мМ бората натрия, 5 мМ ЭДТА, 5 мМ меркаптоэтанол (pH 9,0, буфер А) и разрушали путем обработки ультразвуком. Нерастворимые белки и фрагменты клеток удаляли центрифугированием (13000 об/мин, 30 мин при 5°C). Растворимый белок CMV-Ntt830 в просветленном лизате осаждали с использованием насыщенного раствора сульфата аммония (1:1, об/об) в течение ночи при +4°C. Осажденные белки солиubilизировали в буфере А (без меркаптоэтанол) в течение 4 ч при +4°C. Нерастворимые белки удаляли центрифугированием при небольшой скорости (13000 об/мин, 15 мин при 4°C). Раствор, содержащий растворимый белок CMV-Ntt830, отделяли от клеточных белков ультрацентрифугированием (ротатор SW28, Beckman, Пало Альто, США; при 25000 об/мин, 6 ч, 5°C) в градиенте сахарозы (20-60% раствор сахарозы в буфере А, без меркаптоэтанол, с добавлением 0,5% тритона X-100). Градиент разделяли на шесть фракций, начиная с нижней части градиента. Фракции, содержавшие рекомбинантный CMV-Ntt830, объединяли и диализовали против 200 объемов 5 мМ бората натрия, 2 мМ ЭДТА (pH 9,0) для удаления сахарозы и тритона X-100. После диализа раствор CMV-Ntt830 стерилизовали фильтрованием через 0,2-мкм фильтр. Затем CMV-Ntt830 концентрировали ультрацентрифугированием с использованием ротора Type70 (Beckman, Пало Альто, США) через "подушку" 20% сахарозы в стерильных условиях (50000 об/мин, 4 ч, +5°C). Концентрацию очищенного CMV-Ntt830 оценивали с помощью флуориметра QuBit в соответствии с рекомендациями производителя (Invitrogen, Юджин, США). Концентрированные растворы VLP (прибл. 3 мг/мл) хранили при +4°C в буфере с 5 мМ боратом натрия, 2 мМ ЭДТА (pH 9,0). Все этапы экспрессии и очистки VLP отслеживали с помощью электрофореза в ДСН-ПААГ с использованием 12,5% гелей. Для демонстрации присутствия эпитопа столбнячного анатоксина в VLP CMV использовали масс-спектрометрический анализ очищенных VLP CMV-Ntt830. Как показано на фиг. 3С, основной полученный пик соответствовал теоретической молекулярной массе белка при условии удаления первого остатка метионина при синтезе белка в клетках *E.coli*. Динамическое светорассеяние и электронная микроскопия подтвердили изометрическую морфологию частиц, аналогичных VLP CMVwt (фиг. 4А и 4В).

Пример 5.

Клонирование модифицированного белка оболочки CMV, содержащего эпитоп PADRE (CMV-Npadr).

Для внедрения кодирующей последовательности эпитопа PADRE в ген CMVwt выполнили ПЦР-мутагенез с использованием плазмиды pET-CMVwt в качестве матрицы для амплификации и субклонирования (см. также пример 2 и 3). Для амплификации использовали следующие праймеры: pET-220 (SEQ ID NO: 11) и CMV-padrSal-R (GACGTCGACGCGCGGCCCTTGAGGGTCCACGC GGCCA-CAAATTCGCCATGGT) (SEQ ID NO: 15). Полученный продукт ПЦР (кДНК SEQ ID NO: 16, кодирующую CMV-Npadr согласно SEQ ID NO: 7) повторно субклонировали в сайты BglIII/SalI плазмиды pET-CMVwt. Нужный клон идентифицировали секвенированием и обозначили как pET-CMV-Npadr.

Пример 6.

Экспрессия CMV-Npadr в *E.coli* приводит к получению модифицированных VLP CMV.

Процедуры экспрессии и очистки CMV-Npadr были практически аналогичны процедурам для CMV-Ntt830 и описаны в примере 4. Для демонстрации присутствия эпитопа PADRE в VLP CMV использовали масс-спектрометрический анализ очищенных VLP CMV-Npadr. Как показано на фиг. 3В, основной полученный пик соответствовал теоретической молекулярной массе белка при условии удаления первого остатка метионина при синтезе белка в клетках *E.coli*. Динамическое светорассеяние и электронная микроскопия подтвердили изометрическую морфологию частиц (фиг. 5А и фиг. 5В).

Пример 7.

Клонирование и продукция IL-31 собаки с маркером 6xHis и С-концевым остатком цистеина.

Последовательность кДНК IL31 собаки с кодонами, оптимизированными для *E.coli*, N-концевым маркером 6xHis, сайтом расщепления протеазой TEV, С-концевым остатком цистеина и фланкирующими сайтами рестрикции NcoI и PstI (SEQ ID NO: 17) получили в компании IDT. Затем фрагмент NcoI/PstI

лигировали в соответствующие сайты вектора pET42. Конструкт трансформировали в химически компетентные клетки *E. coli* DH5 α и высевали колонии на чашки с LB-агаром, содержащим ампициллин. Последовательность полученных клонов проверяли секвенированием по Сэнгеру. Затем полученный конструкт pET42_6HcIL31C трансформировали в химически компетентные клетки *E. coli* BL21-DE3.

Биомассу посевного материала получили путем посева клеток BL31-DE3, трансформированных IL31-pET42, в среду LB, содержащую 50 мкг/мл ампициллина, и инкубирования в течение ночи при +37°C. Затем биомассу внесли в среду 2TY при соотношении объемов 1:20. Клетки выращивали при +37°C и перемешивании до достижения оптической плотности при длине волны 540 нм, равной 0,7 единиц. Затем индуцировали экспрессию белка (SEQ ID NO: 18) с использованием 1 mM ИПТГ и выращивали клетки в течение еще 4 часов при +37°C и перемешивании. Продукцию белка подтверждали путем загрузки общего клеточного экстракта для электрофореза в ДСН-ПААГ (фиг. 6).

Биомассу собирали центрифугированием и суспендировали в ледяном лизирующем буфере, содержащем 40 mM трис-HCl (pH 8,0), 200 mM NaCl, 20 mM MgSO₄, 0,1 мг/мл ДНКазы I, 1 mM ФМСФ и 1% тритон X-100, поддерживая соотношение 1 г сырых клеток на 5 мл лизирующего буфера. Клетки лизировали путем обработки ультразвуком на льду, полученный лизат центрифугировали в течение 40 мин при 15000 g, надосадочную жидкость выбрасывали. К осадку добавляли буфер для промывки WB1, содержащий 20 mM трис-HCl, pH 8,0, и 1 M NaCl, поддерживая соотношение 3 мл WB1 на 1 г исходной массы сырых клеток. Осадок ресуспендировали путем встряхивания на вортексе, инкубировали на качалке в течение 1 ч при комнатной температуре и центрифугировали в течение 15 мин при 15000 g. Промывку осадка повторяли еще раз с использованием буфера для промывки WB2, содержащего 20 mM трис-HCl, pH 8,0, 200 mM NaCl и 1 M мочевины. Белок-мишень обнаруживали в осажденной фракции. Затем осадок ресуспендировали в буфере для элюирования EB1, содержащем 8 M мочевины, 20 mM трис-HCl, pH 8, и 100 mM NaH₂PO₄, поддерживая соотношение 3 мл EB1 на 1 г исходной массы сырых клеток, и инкубировали на качалке при комнатной температуре в течение ночи. После центрифугирования надосадочная жидкость содержала белок приблизительно 90% чистоты (фиг. 7). 1 мл полученной надосадочной жидкости по каплям добавляли к 20 мл буфера для рефолдинга RB, содержащего 20 mM трис-HCl, pH 8,0, 50 mM NaCl, 1 M глицина и 5 mM (3-меркаптоэтанол), и инкубировали в течение 2 ч при комнатной температуре при перемешивании. Затем надосадочную жидкость концентрировали до объема 1 мл на фильтрующем блоке Amicon (номинальное отсечение по молекулярной массе 10 кДа) и диализовали в течение 48 ч при +4°C против 1000 мл PBS. После этого образец центрифугировали и загружали на колонку SuperdexTM 200 10/300 GL в PBS. Профиль колонки указывал, что белок-мишень элюировался в исключенный объем, таким образом, по всей вероятности, образуя растворимые агрегаты (фиг. 8).

Пример 8.

Клонирование и продукция рекомбинантного нативного IL-31 собаки.

IL-31 собаки амплифицировали с плазмиды, содержащей SEQ ID NO: 17, посредством ПЦР с использованием праймеров cIL3 INATf (TACACCATGGCCTCCCACATGGCTCCAACG, SEQ ID NO: 19) и cIL31NATr (CATACTGCAGTTACTGCGGTCCACTGTTTAAG, SEQ ID NO: 20), содержащих сайты PstI и NcoI. Полученный ПЦР-фрагмент cIL-31 гидролизovali с использованием ферментов рестрикции PstI и NcoI и лигировали в соответствующие сайты вектора pET42. Конструкт трансформировали в химически компетентные клетки *E. coli* DH5 α и высевали колонии на чашки с LB-агаром, содержащим ампициллин. Положительные клоны выявляли секвенированием по Сэнгеру. Затем конструкт cIL31-pET42 трансформировали в химически компетентные клетки *E. coli* BL21-DE3.

Биомассу посевного материала получили путем посева клеток BL31-DE3, трансформированных cIL31-pET42, в среду LB, содержащую 50 мкг/мл ампициллина, и инкубирования в течение ночи при +37°C. Затем биомассу внесли в среду 2TY при соотношении объемов 1:20. Клетки выращивали при +37°C и перемешивании до достижения оптической плотности при длине волны 540 нм, равной 0,7 единиц. Затем индуцировали экспрессию белка (SEQ ID NO: 21) с использованием 1 mM ИПТГ и выращивали клетки в течение еще 4 часов при +37°C и перемешивании. Продукцию белка подтверждали путем загрузки общего клеточного экстракта для электрофореза в ДСН-ПААГ (фиг. 9).

Биомассу собирали центрифугированием и суспендировали в ледяном лизирующем буфере, содержащем 40 mM трис-HCl (pH 8,0), 200 mM NaCl, 20 mM MgSO₄, 0,1 мг/мл ДНКазы I, 1 mM ФМСФ и 1% тритон X-100, поддерживая соотношение 1 г клеток на 5 мл лизирующего буфера. Клетки лизировали путем обработки ультразвуком на льду, полученный лизат центрифугировали в течение 40 мин при 15000 g. Надосадочную жидкость выбрасывали, к осадку добавляли лизирующий буфер, поддерживая соотношение 1,5 мл лизирующего буфера на 1 г исходной массы сырых клеток. Осадок суспендировали в раствор путем обработки ультразвуком, раствор центрифугировали в течение 20 мин при 15000 g. Надосадочную жидкость выбрасывали, осадок 5-кратно промывали лизирующим буфером, как описано выше. После этапов промывки осадок ресуспендировали в 6,86 M мочеvine и 20 mM дитиотрейтоле посредством обработки ультразвуком. Раствор центрифугировали в течение 20 мин при 15000 g, надосадочную жидкость разбавляли буфером для рефолдинга, содержащим 50 mM трис-HCl, 1 M глицина, 1 mM ЭДТА и 5 mM (3-меркаптоэтанол), поддерживая соотношение 75 мл буфера для рефолдинга на 1 мл раствора мочевины и дитиотрейтола. Рефолдинг выполняли в течение ночи при +4°C и перемешивании.

Затем раствор фильтровали с использованием 22-мкм фильтра и концентрировали ультрафильтрацией с использованием устройства с отсечкой по молекулярной массе 10 кДа (Amicon) с 200 мл до 4 мл. Затем раствор центрифугировали при 15000 g в течение 10 минут для удаления остаточного осадка. Раствор загружали на колонку Superdex 200 для гель-фильтрации (16×600 мм), ранее уравновешенную буфером для рефолдинга, и фракционировали (2 мл на фракцию, скорость потока 2 мл/мин). Фракции, содержавшие белок cIL-31, выявляли электрофорезом в ДСН-ПААГ, объединяли и концентрировали ультрафильтрацией с использованием устройства с отсечкой по молекулярной массе 10 кДа (Amicon) до объема 3 мл. Повторную хроматографию выполняли на той же колонке Superdex 200 для гель-фильтрации, как и раньше. Колонку на этапе повторной хроматографии уравнивали в буфере PBS (0,1 М фосфата натрия, pH 7,2, и 0,15 М NaCl). Фракции анализировали электрофорезом в ДСН-ПААГ (фиг. 10), четыре фракции, содержавшие наиболее чистый белок cIL-31 (SEQ ID NO: 21), объединяли, концентрировали до 4 мг/мл путем ультрафильтрации на устройстве с отсечкой по молекулярной массе 10 кДа (Amicon) и использовали в дальнейшем для экспериментов по присоединению к VLP CMV.

Пример 9.

Присоединение рекомбинантных конструкторов IL-31 собаки к VLP CMV-Npadr и VLP CMV-Ntt830 и иммунизация мышей и собак.

А. Присоединение cIL-31 к VLP.

100 мкл раствора (4 мг/мл в буфере PBS) белка cIL-31 (SEQ ID NO: 21), полученного в примере 8, смешивали с 4,8 мкл 55 мМ N-сукцинимидил-S-ацетилтиоацетата (SATA, Thermo Fisher Scientific) в ДМСО и инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре (КТ). Непрореагировавший SATA удаляли 4х заменой буфера на PBS (0,1 М натрий-фосфатный буфер, pH 7,2, и 0,15 М NaCl) с использованием блока для фильтрации Amicon Ultra-0.5 3K (Merck-Millipore), конечный объем доводили до 100 мкл. С сульфгидрильных групп снимали защиту путем добавления 10 мкл раствора для деацетилирования (0,5 М гидроксилamina и 25 мМ ЭДТА в PBS) и инкубирования в течение 2 ч при КТ. Раствор для деацетилирования удаляли 4х заменой буфера на PBS с использованием блоков для фильтрации Amicon Ultra-0.5 3K (Merck-Millipore), конечный объем доводили до 100 мкл.

VLP CMV-Ntt830 в объеме 250 мкл с концентрацией 1,5 мг/мл в 5 мМ NaHPO₄ pH 7,5, 2 мМ ЭДТА, смешивали с 3 мкл 50 мМ раствора сукцинимидил-6-(b-малеимидпропионамид)гексаноата (SMPH) в ДМСО и инкубировали в течение 1 часа при КТ. Количество SMPH соответствовало 7,5х молярному избытку по отношению к мономеру VLP, т.е. одному полипептиду CMV. Непрореагировавший SMPH удаляли 4х заменой буфера на 5 мМ NaHPO₄ pH 7,5, 2 мМ ЭДТА, pH 8,0, с использованием блоков фильтрации Amicon Ultra-0.5 3K (Merck-Millipore), конечный объем доводили до 250 мкл.

Для реакции присоединения 100 мкл VLP, обработанных SMPH, смешивали с 43 мкл обработанного SATA и деацетилированного cIL-31 согласно SEQ ID NO: 21 и инкубировали в течение 3 ч при КТ. Полученный продукт проверяли электрофорезом в ДСН-ПААГ (фиг. 11) и электронной микроскопией (фиг. 12). Анализ в геле с ДСН подтвердил присутствие продукта химического присоединения с ожидаемой молекулярной массой, а анализ посредством ЭМ подтвердил присутствие интактных VLP.

В. Иммунизация мышей cIL-31, присоединенным к VLP CMV-Npadr и CMV-Ntt830.

Группы из пяти самок мышей Balb/c иммунизировали в 0 день и 14 день путем п/к введения 50 мкг VLP CMV-Npadr и VLP CMV-Ntt830, присоединенных посредством SATA к cIL-31 согласно SEQ ID NO: 21 в составе с PBS. Пробоотбор крови у мышей выполняли в 0 день (до иммунизации), 14 день и 28 день, сыворотку анализировали посредством твердофазного ИФА, специфичного по отношению к cIL-31.

Твердофазный ИФА Гуморальный ответ анализировали в сыворотке мышей в указанное время. Антитела, специфичные по отношению к cIL-31, анализировали иммобилизацией рекомбинантного cIL-31 на планшетах для твердофазного ИФА в концентрации 5 мкг/мл в объеме 100 мкл в PBS (pH 7,2) при 4°C в течение ночи. Планшеты для твердофазного ИФА 5х промывали 200 мкл PBS, содержащего 0,05% твин-20 (pH 7,2, PBST). Во избежание неспецифического связывания планшеты для твердофазного ИФА блокировали 200 мкл 2% БСА в PBST и инкубировали в течение 2 часов при КТ. Образцы сыворотки разбавляли 2% БСА/PBST. Предварительно разбавленную сыворотку переносили на покрытые планшеты и в дальнейшем последовательно разбавляли с получением титров антител на основании расчета OD50. Через 2 часа инкубирования при КТ планшеты для твердофазного ИФА 5х промывали 200 мкл PBST. Связывание антител сыворотки обнаруживали с использованием антител козы против IgG мыши, конъюгированных с пероксидазой хрена (Jackson ImmunoResearch). Детектирующее антитело разбавляли в соотношении 1:1000 2% БСА/PBST и переносили объем 100 мкл на образец. Планшеты инкубировали в течение 1 часа при КТ. Планшеты для твердофазного ИФА промывали в соответствии с вышеприведенным описанием. Перед промывкой получали раствор субстрата. Для этого 1 таблетку (10 мг) ОФД (дигидрохлорида 1,2-фенилендиамина) и 9 мкл 30% H₂O₂ растворяли в 25 мл буфера на основе лимонной кислоты (0,066 М Na₂HPO₄, 0,035 М лимонной кислоты, pH 5,0). 100 мкл раствора субстрата переносили пипеткой на планшеты и инкубировали в течение ровно 7 минут при КТ. Для остановки реакции 50 мкл стоп-раствора (5% H₂SO₄ в H₂O) переносили пипеткой непосредственно на планшеты. Выполняли анализ показаний оптической плотности цветной реакции дигидрохлорида 1,2-фенилендиамина при длине волны 450 нм.

С. Иммунизация собак cIL-31, присоединенным к VLP CMV-Npadr и CMV-Ntt830.

Группы из пяти собак иммунизировали в 0 день и 14 день, 28 день и 42 день путем п/к введения 50 мкг VLP CMV-Npadr и VLP CMV-Ntt830, присоединенных посредством SATA к cIL-31 согласно SEQ ID NO: 21 в составе с PBS. Пробоотбор крови у собак выполняли в 0 день (до иммунизации), 14 день, 28 день, 42 день и 56 день, сыворотку анализировали посредством твердофазного ИФА, специфичного по отношению к cIL-31.

Твердофазный ИФА. Гуморальный ответ анализировали в сыворотке собак в указанное время. Антитела, специфичные по отношению к cIL-31, анализировали иммобилизацией рекомбинантного cIL-31 на планшетах для твердофазного ИФА в концентрации 5 мкг/мл в объеме 100 мкл в PBS (pH 7,2) при 4°C в течение ночи. Планшеты для твердофазного ИФА 5х промывали 200 мкл PBS, содержащего 0,05% твин-20 (pH 7,2, PBST). Во избежание неспецифического связывания планшеты для твердофазного ИФА блокировали 200 мкл 2% БСА в PBST и инкубировали в течение 2 часов при КТ. Образцы сыворотки разбавляли 2% БСА/PBST. Предварительно разбавленную сыворотку переносили на покрытые планшеты и в дальнейшем последовательно разбавляли с получением титров антител на основании расчета OD50. Через 2 часа инкубирования при КТ планшеты для твердофазного ИФА 5х промывали 200 мкл PBST. Связывание антител сыворотки обнаруживали с использованием антител козы против IgG собаки, конъюгированных с пероксидазой хрена (Jackson ImmunoResearch). Детектирующее антитело разбавляли в соотношении 1:1000 2% БСА/PBST и переносили объем 100 мкл на образец. Планшеты инкубировали в течение 1 часа при КТ. Планшеты для твердофазного ИФА промывали в соответствии с вышеприведенным описанием. Перед промывкой получали раствор субстрата. Для этого 1 таблетку (10 мг) ОФД (дигидрохлорида 1,2-фенилендиамина) и 9 мкл 30% H₂O₂ растворяли в 25 мл буфера на основе лимонной кислоты (0,066 М Na₂HPO₄, 0,035 М лимонной кислоты, pH 5,0). 100 мкл раствора субстрата переносили пипеткой на планшеты и инкубировали в течение ровно 7 минут при КТ. Для остановки реакции 50 мкл стоп-раствора (5% H₂SO₄ в H₂O) переносили пипеткой непосредственно на планшеты. Выполняли анализ показаний оптической плотности цветной реакции дигидрохлорида 1,2-фенилендиамина при длине волны 450 нм.

Пример 10.

Терапевтическая иммунизация собак рекомбинантными конструктами IL-31 собаки, присоединенными к VLP CMV-Ntt830, для лечения атопического дерматита собак.

Группы из 15 собак иммунизировали в 0 день и 14 день, 28 день, 56 день и 80 день путем п/к введения 50 мкг VLP CMV-Ntt830, присоединенных посредством SATA к cIL-31 согласно SEQ ID NO: 21, или только CMV-Ntt830 в составе с квасцами. Тяжесть заболевания измеряли путем визуального осмотра перед иммунизацией и в 28 день, 56 день, 80 день и 120 день.

Пример 11.

Балльная оценка АДС

Для балльной оценки симптомов АДС у подопытных собак использовали показатель поражений при атопическом дерматите (ADLI) и визуальный аналоговый балльный показатель зуда (PVAS). Показатель ADLI представляет собой проверенный объединенный показатель шести клинических симптомов, ассоциированных с атопическим дерматитом собак и оцениваемых по пяти указанным частям тела. Оценщик выполнял балльную оценку каждого параметра в каждой указанной части тела по шкале от нуля до пяти, причем оценка "нуль" означала отсутствие очагов, а оценка "пять" - тяжелые/обширные очаги. Оценщик выполнял балльную оценку PVAS по аналоговой шкале от нуля до десяти, причем оценка "нуль" представляла собой отсутствие зуда/выкусывания, а оценка "десять" - непрерывный интенсивный зуд/выкусывание. Балльный показатель АДС у собак, подвергаемых лечению, сравнивали с исходным уровнем, а также с показателями у собак, получавших плацебо.

Пример 12.

Вакцинация собак с аллергией на клещей домашней пыли с использованием VLP cIL-31-CMV-Ntt830 и последующая повторная иммунизация.

Шесть собак с аллергией иммунизировали 100 мкг VLP cIL-31-CMV-Ntt830 в составе с квасцами, и шесть собак с аллергией обработали плацебо (квасцами). Через три недели собак повторно иммунизировали 300 мкг вакцины или плацебо. Пробоотбор крови выполняли в 28 день. В 28 день с кожи на брюхе удаляли шерсть липкой лентой и выполняли стимуляцию клещами домашней пыли раз в день в течение десяти минут пять дней подряд. Балльную оценку поражений кожи и зуда выполняли у 12 собак в ходе клинического обследования посредством видеозаписи собак в течение шести часов/день.

На фиг. 13А показано поведение собак, связанное с расчесыванием, до и после вакцинации. Наблюдалось сильное снижение расчесывания, причем 5/6 вакцинированных собак практически прекратили расчесываться, в то время как поведение животных, получавших плацебо, не изменилось.

Определение титров cIL-31-специфических IgG. Гуморальный ответ в сыворотке собак анализировали на 28 день. Антитела, специфичные по отношению к cIL-31, анализировали иммобилизацией рекомбинантного cIL-31 на планшетах для твердофазного ИФА в концентрации 3 мкг/мл в объеме 100 мкл в PBS (pH 7,2) при 4°C в течение ночи. Планшеты для твердофазного ИФА 5х промывали 200 мкл PBS, содержащего 0,05% твин-20 (pH 7,2, PBST). Во избежание неспецифического связывания планшеты для

твердофазного ИФА блокировали 200 мкл 2% БСА в PBST и инкубировали в течение 2 часов при КТ. Образцы сыворотки разбавляли 2% БСА/PBST. Предварительно разбавленную (10-кратно) сыворотку переносили на покрытые планшеты и в дальнейшем последовательно разбавляли (этапы 3-кратного разбавления) с получением титров антител на основании расчета OD50. Через 2 часа инкубирования при КТ планшеты для твердофазного ИФА 5х промывали 200 мкл PBST. Связывание антител сыворотки обнаруживали с использованием антител козы против IgG собаки, конъюгированных с пероксидазой хрена (Jackson ImmunoResearch). Детектирующее антитело разбавляли в соотношении 1:1000 2% БСА/PBST и переносили объем 100 мкл на образец. Планшеты инкубировали в течение 1 часа при КТ. Планшеты для твердофазного ИФА промывали в соответствии с вышеприведенным описанием. Перед промывкой получали раствор 5 субстратов. Для этого 1 таблетку (10 мг) ОФД (дигидрохлорида 1,2-фенилендиамина) и 9 мкл 30% H₂O₂ растворяли в 25 мл буфера на основе лимонной кислоты (0,066 М Na₂HPO₄, 0,035 М лимонной кислоты, pH 5,0). 100 мкл раствора субстрата переносили пипеткой на планшеты и инкубировали в течение ровно 7 минут при КТ. Для остановки реакции 50 мкл стоп-раствора (5% H₂SO₄ в H₂O) переносили пипеткой непосредственно на планшеты. Показания оптической плотности цветной реакции дигидрохлорида 1,2-фенилендиамина при длине волны 450 нм анализировали и выражали в виде log3 в 10-кратно предварительно разбавленной сыворотке (фиг. 13В). На фиг. 13В показана корреляция между титрами IL-31-специфических антител и интенсивностью расчесывания. У одной собаки, которая продолжала расчесываться, поддерживался самый низкий гуморальный ответ, и обнаружено, что ориентировочный титр <1/300 являлся протективным.

Список последовательностей

<110> Benchmark Animal Health Ltd
Tars, Kaspars

<120> Лечение атопического дерматита собак

<130> P5139PC00

<150> EP16167264.7

<151> 27.04.2016

<160> 30

<170> Версия PatentIn 3.5

<210> 1

<211> 218

<212> БЕЛОК

<213> вирус мозаики огурца

<400> 1

Met Asp Lys Ser Glu Ser Thr Ser Ala Gly Arg Ser Arg Arg Arg Arg
1 5 10 15

Pro Arg Arg Gly Ser Arg Ser Ala Pro Ser Ser Ala Asp Ala Asn Phe
20 25 30

Arg Val Leu Ser Gln Gln Leu Ser Arg Leu Asn Lys Thr Leu Ala Ala
35 40 45

Gly Arg Pro Thr Ile Asn His Pro Thr Phe Val Gly Ser Glu Arg Cys
50 55 60

Lys Pro Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Ile Thr Leu Lys Pro Pro Lys Ile
65 70 75 80

045381

Asp Arg Gly Ser Tyr Tyr Gly Lys Arg Leu Leu Leu Pro Asp Ser Val
85 90 95

Thr Glu Tyr Asp Lys Lys Leu Val Ser Arg Ile Gln Ile Arg Val Asn
100 105 110

Pro Leu Pro Lys Phe Asp Ser Thr Val Trp Val Thr Val Arg Lys Val
115 120 125

Pro Ala Ser Ser Asp Leu Ser Val Ala Ala Ile Ser Ala Met Phe Ala
130 135 140

Asp Gly Ala Ser Pro Val Leu Val Tyr Gln Tyr Ala Ala Ser Gly Val
145 150 155 160

Gln Ala Asn Asn Lys Leu Leu Tyr Asp Leu Ser Ala Met Arg Ala Asp
165 170 175

Ile Gly Asp Met Arg Lys Tyr Ala Val Leu Val Tyr Ser Lys Asp Asp
180 185 190

Ala Leu Glu Thr Asp Glu Leu Val Leu His Val Asp Val Glu His Gln
195 200 205

Arg Ile Pro Thr Ser Gly Val Leu Pro Val
210 215

<210> 2
<211> 217
<212> БЕЛОК
<213> вирус мозаики огурца

<400> 2

Asp Lys Ser Glu Ser Thr Ser Ala Gly Arg Asn Arg Arg Arg Arg Pro
1 5 10 15

Arg Arg Gly Ser Arg Ser Ala Ser Ser Ser Ala Asp Ala Asn Phe Arg
20 25 30

Val Leu Ser Gln Gln Leu Ser Arg Leu Asn Lys Thr Leu Ala Ala Gly
35 40 45

Arg Pro Thr Ile Asn His Pro Thr Phe Val Gly Ser Glu Arg Cys Lys
50 55 60

Pro Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Ile Thr Leu Lys Pro Pro Lys Ile Asp
65 70 75 80

045381

Arg Gly Ser Tyr Tyr Gly Lys Arg Leu Leu Leu Pro Asp Ser Val Thr
85 90 95

Glu Phe Asp Lys Lys Leu Val Ser Arg Ile Gln Ile Arg Val Asn Pro
100 105 110

Leu Pro Lys Phe Asp Ser Thr Val Trp Val Thr Val Arg Lys Val Pro
115 120 125

Ala Ser Ser Asp Leu Ser Val Ala Ala Ile Ser Ala Met Phe Ala Asp
130 135 140

Gly Ala Ser Pro Val Leu Val Tyr Gln Tyr Ala Ala Ser Gly Val Gln
145 150 155 160

Ala Asn Asn Lys Leu Leu Tyr Asp Leu Ser Ala Met Arg Ala Asp Ile
165 170 175

Gly Asp Met Arg Lys Tyr Ala Val Leu Val Tyr Ser Lys Asp Asp Ala
180 185 190

Leu Glu Thr Asp Glu Leu Val Leu His Val Asp Ile Glu His Gln Arg
195 200 205

Ile Pro Thr Ser Gly Val Leu Pro Val
210 215

<210> 3
<211> 218
<212> БЕЛОК
<213> вирус мозаики огурца

<400> 3

Met Asp Lys Ser Glu Ser Pro Asn Ala Ser Arg Thr Ser Arg Arg Arg
1 5 10 15

Arg Pro Arg Arg Gly Ser Arg Ser Ala Ser Gly Ala Asp Ala Gly Leu
20 25 30

Arg Ala Leu Thr Gln Gln Met Leu Lys Leu Asn Lys Thr Leu Ala Ile
35 40 45

Gly Arg Pro Thr Leu Asn His Pro Thr Phe Val Gly Ser Ala Ser Cys
50 55 60

Lys Pro Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Ile Thr Leu Lys Pro Pro Glu Ile
65 70 75 80

045381

Glu Lys Gly Ser Tyr Phe Gly Arg Arg Leu Ser Leu Pro Asp Ser Val
85 90 95

Thr Asp Tyr Asp Lys Lys Leu Val Ser Arg Ile Gln Ile Arg Ile Asn
100 105 110

Pro Leu Pro Lys Phe Asp Ser Thr Val Trp Val Thr Val Arg Lys Val
115 120 125

Pro Ser Ser Ser Asp Leu Ser Val Ala Thr Ile Ser Ala Met Phe Gly
130 135 140

Asp Gly Asn Ser Pro Val Leu Val Tyr Gln Tyr Thr Ala Ser Gly Val
145 150 155 160

Gln Ala Asn Asn Lys Leu Leu Tyr Asp Leu Ser Glu Met Arg Ala Asp
165 170 175

Ile Gly Asp Met Arg Lys Tyr Ala Val Leu Val Tyr Ser Lys Asp Asp
180 185 190

Lys Leu Glu Glu Asp Glu Ile Val Leu His Val Asp Val Glu His Gln
195 200 205

Arg Ile Pro Ile Ser Arg Met Leu Pro Thr
210 215

<210> 4
<211> 14
<212> БЕЛОК
<213> искусственная последовательность

<220>
<223> эпитоп столбнячного анатоксина tt830

<400> 4

Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu
1 5 10

<210> 5
<211> 13
<212> БЕЛОК
<213> искусственная последовательность

<220>
<223> PADRE

<400> 5

Ala Lys Phe Val Ala Ala Trp Thr Leu Lys Ala Ala Ala
1 5 10

<210> 6
 <211> 222
 <212> БЕЛОК
 <213> искусственная последовательность

<220>
 <223> CMV-Ntt830

<400> 6

Met Gly Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu
 1 5 10 15

Arg Arg Arg Arg Pro Arg Arg Gly Ser Arg Ser Ala Pro Ser Ser Ala
 20 25 30

Asp Ala Asn Phe Arg Val Leu Ser Gln Gln Leu Ser Arg Leu Asn Lys
 35 40 45

Thr Leu Ala Ala Gly Arg Pro Thr Ile Asn His Pro Thr Phe Val Gly
 50 55 60

Ser Glu Arg Cys Lys Pro Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Ile Thr Leu Lys
 65 70 75 80

Pro Pro Lys Ile Asp Arg Gly Ser Tyr Tyr Gly Lys Arg Leu Leu Leu
 85 90 95

Pro Asp Ser Val Thr Glu Tyr Asp Lys Lys Leu Val Ser Arg Ile Gln
 100 105 110

Ile Arg Val Asn Pro Leu Pro Lys Phe Asp Ser Thr Val Trp Val Thr
 115 120 125

Val Arg Lys Val Pro Ala Ser Ser Asp Leu Ser Val Ala Ala Ile Ser
 130 135 140

Ala Met Phe Ala Asp Gly Ala Ser Pro Val Leu Val Tyr Gln Tyr Ala
 145 150 155 160

Ala Ser Gly Val Gln Ala Asn Asn Lys Leu Leu Tyr Asp Leu Ser Ala
 165 170 175

Met Arg Ala Asp Ile Gly Asp Met Arg Lys Tyr Ala Val Leu Val Tyr
 180 185 190

Ser Lys Asp Asp Ala Leu Glu Thr Asp Glu Leu Val Leu His Val Asp
 195 200 205

Val Glu His Gln Arg Ile Pro Thr Ser Gly Val Leu Pro Val
 210 215 220

<210> 7
 <211> 220
 <212> БЕЛОК
 <213> искусственная последовательность

<220>
 <223> CMV-Npadr

<400> 7

Met Ala Lys Phe Val Ala Ala Trp Thr Leu Lys Ala Ala Ala Arg Arg
 1 5 10 15

Arg Arg Pro Arg Arg Gly Ser Arg Ser Ala Pro Ser Ser Ala Asp Ala
 20 25 30

Asn Phe Arg Val Leu Ser Gln Gln Leu Ser Arg Leu Asn Lys Thr Leu
 35 40 45

Ala Ala Gly Arg Pro Thr Ile Asn His Pro Thr Phe Val Gly Ser Glu
 50 55 60

Arg Cys Lys Pro Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Ile Thr Leu Lys Pro Pro
 65 70 75 80

Lys Ile Asp Arg Gly Ser Tyr Tyr Gly Lys Arg Leu Leu Leu Pro Asp
 85 90 95

Ser Val Thr Glu Tyr Asp Lys Lys Leu Val Ser Arg Ile Gln Ile Arg
 100 105 110

Val Asn Pro Leu Pro Lys Phe Asp Ser Thr Val Trp Val Thr Val Arg
 115 120 125

Lys Val Pro Ala Ser Ser Asp Leu Ser Val Ala Ala Ile Ser Ala Met
 130 135 140

Phe Ala Asp Gly Ala Ser Pro Val Leu Val Tyr Gln Tyr Ala Ala Ser
 145 150 155 160

Gly Val Gln Ala Asn Asn Lys Leu Leu Tyr Asp Leu Ser Ala Met Arg
 165 170 175

Ala Asp Ile Gly Asp Met Arg Lys Tyr Ala Val Leu Val Tyr Ser Lys
 180 185 190

Asp Asp Ala Leu Glu Thr Asp Glu Leu Val Leu His Val Asp Val Glu

195	200	205
His Gln Arg Ile Pro Thr Ser Gly Val Leu Pro Val		
210	215	220
<210> 8		
<211> 34		
<212> ДНК		
<213> искусственная последовательность		
<220>		
<223> праймер СМсрF		
<400> 8		
caccatggac aaatctgaat caaccagtgc tgggt		34
<210> 9		
<211> 37		
<212> ДНК		
<213> искусственная последовательность		
<220>		
<223> праймер СМсрR		
<400> 9		
caaagcttat caaactggga gcacccacaga tgtggga		37
<210> 10		
<211> 660		
<212> ДНК		
<213> вирус мозаики огурца		
<400> 10		
atggacaaat ctgaatcaac cagtgcctgggt cgtagccgtc gacgtcgtcc gcgtcgtgggt		60
tcccgcctccg cccctcctc cgcggatgct aacttttagag tcttgctgca gcagctttcg		120
cgacttaata agacgttagc agctggctgt ccaactatta accacccaac ctttgtaggg		180
agtgaacgct gtaaacctgg gtacacgttc acatctatca ccctaaagcc accaaaaata		240
gaccgtgggt cttattatgg taaaagggtg ttattacctg attcagtcac ggaatatgat		300
aagaaacttg tttcgcgcac tcaaattcga gttaatcctt tgccgaaatt tgattcaacc		360
gtgtgggtga cagtccgtaa agttcctgcc tcttcggact tatccgttgc cgccatttct		420
gctatgtttg cggacggagc ctcaccggta ctgggtttatc agtacgctgc atctggagtc		480
caagctaaca acaaactggt gtatgatctt tcggcgatgc gcgctgatat aggcgacatg		540
agaaagtacg ccgtcctcgt gtattcaaaa gacgatgcac tcgagacaga cgagttagta		600
cttcatgttg acgtcgagca ccaacgtatt cccacatctg ggggtgctccc agtttgataa		660
<210> 11		
<211> 20		
<212> ДНК		

<213> искусственная последовательность

<220>

<223> праймер pET-220

<400> 11
 агсассгссг ссгсааггаа 20

<210> 12
 <211> 52
 <212> ДНК
 <213> искусственная последовательность

<220>

<223> праймер CMV-tt83-1R

<400> 12
 atttgaggtt ggccttaata tactggccca tggatatatct ccttcttaaa gt 52

<210> 13
 <211> 52
 <212> ДНК
 <213> искусственная последовательность

<220>

<223> праймер CMV-tt83Sal-R2

<400> 13
 gacgtcgacg ctcggtaatc ccgataaatt tggagttggc cttaatatac tg 52

<210> 14
 <211> 672
 <212> ДНК
 <213> искусственная последовательность

<220>

<223> кДНК, кодирующая CMV-Ntt830

<400> 14
 atgggccagt atattaaggc caactccaaa tttatcggga ttaccgagcg tcgacgtcgt 60
 ccgcgtcgtg gttcccgctc cgcctccctcc tccgcggatg ctaactttag agtcttgctg 120
 cagcagcttt cgcgacttaa taagacgtta gcagctggtc gtccaactat taaccaccca 180
 acctttgtag ggagtgaacg ctgtaaacct gggtagacgt tcacatctat caccctaaag 240
 ccaccaaaaa tagaccgtgg gtcttattat ggtaaaagggt tgttattacc tgattcagtc 300
 acggaatatg ataagaaact tgtttcgcgc attcaaattc gagttaatcc tttgccgaaa 360
 tttgattcaa ccgtgtgggt gacagtcctg aaagttcctg cctcttcgga cttatccgtt 420
 gccgccatth ctgctatggt tgcggacgga gcctcaccgg tactggttta tcagtacgct 480
 gcatctggag tccaagctaa caacaaactg ttgtatgac tttcggcgat gcgcgctgat 540
 ataggcgaca tgagaaagta cgcgcctctc gtgtattcaa aagacgatgc actcgagaca 600
 gacgagttag tacttcatgt tgacgtcgag caccaacgta ttcccacatc tgggggtgctc 660

ccagtttgat aa

672

<210> 15
 <211> 55
 <212> ДНК
 <213> искусственная последовательность

<220>
 <223> праймер CMV-padrSal-R

<400> 15
 gacgtcgacg cgcggccgcc ttgaggggtcc acgcggccac aaatttcgcc atggt 55

<210> 16
 <211> 666
 <212> ДНК
 <213> искусственная последовательность

<220>
 <223> кДНК, кодирующая CMV-Npadr

<400> 16
 atggcgaaat ttgtggccgc gtggaccctc aaggcggccg cgcgtcgacg tcgtccgcgt 60
 cgtgggtccc gctccgcccc ctctccgcg gatgctaact ttagagtctt gtcgcagcag 120
 ctttcgcgac ttaataagac gttagcagct ggtcgtccaa ctattaacca cccaaccttt 180
 gtagggagtg aacgctgtaa acctgggtac acgttcacat ctatcacctt aaagccacca 240
 aaaatagacc gtgggtctta ttatggtaaa aggttggttat tacctgattc agtcacggaa 300
 tatgataaga aacttgtttc gcgcattcaa attcgagtta atcctttgcc gaaatttgat 360
 tcaaccgtgt gggtgacagt ccgtaaagtt cctgcctctt cggacttata cgttgccgcc 420
 atttctgcta tgtttgcgga cggagcctca ccggtactgg tttatcagta cgctgcatct 480
 ggagtccaag ctaacaacaa actgttgat gatctttcgg cgatgcgcgc tgatataggc 540
 gacatgagaa agtacgccgt cctcgtgtat tcaaaagacg atgcactcga gacagacgag 600
 ttagtacttc atgttgacgt cgagcaccaa cgtattccca catctgggggt gctcccagtt 660
 tgataa 666

<210> 17
 <211> 464
 <212> ДНК
 <213> искусственная последовательность

<220>
 <223> кДНК His6/TEV/C

<400> 17
 ccatggccca tcataccat catcacgaaa acctgtactt tcaatcccac atggctccaa 60
 cgcatacagct gcctccatcc gatgtgcgca agatcattct ggaactccag ccgctcagcc 120

```

gtggactgtt agaagactac cagaagaaag aaacgggggt cccagaatct aaccgtacgc      180
tgctgctgtg cctgacgagc gatagccagc ctctctgtct gaacagctcc gcgatcttac      240
cctacttttcg tgccatccgc cctctgtccg ataagaatat tattgacaaa atcattgagc      300
aactggataa gctgaaattht cagcacgaac ctgagacgga gattagtgtc ccggcgggata      360
cgtttgaatg taagagtttt atcctcaciaa ttctccagca attttctgcg tgcttggaat      420
cagtatttaa gtccttaaac agtggaccgc agtgctaact gcag                          464

```

<210> 18

<211> 151

<212> БЕЛОК

<213> ИСКУССТВЕННАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ

<220>

<223> cIL-31-His6/TEV/C

<400> 18

```

Met Ala His His His His His His Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Ser His
1              5              10              15

```

```

Met Ala Pro Thr His Gln Leu Pro Pro Ser Asp Val Arg Lys Ile Ile
                20              25              30

```

```

Leu Glu Leu Gln Pro Leu Ser Arg Gly Leu Leu Glu Asp Tyr Gln Lys
    35              40              45

```

```

Lys Glu Thr Gly Val Pro Glu Ser Asn Arg Thr Leu Leu Leu Cys Leu
    50              55              60

```

```

Thr Ser Asp Ser Gln Pro Pro Arg Leu Asn Ser Ser Ala Ile Leu Pro
65              70              75              80

```

```

Tyr Phe Arg Ala Ile Arg Pro Leu Ser Asp Lys Asn Ile Ile Asp Lys
            85              90              95

```

```

Ile Ile Glu Gln Leu Asp Lys Leu Lys Phe Gln His Glu Pro Glu Thr
    100              105              110

```

```

Glu Ile Ser Val Pro Ala Asp Thr Phe Glu Cys Lys Ser Phe Ile Leu
    115              120              125

```

```

Thr Ile Leu Gln Gln Phe Ser Ala Cys Leu Glu Ser Val Phe Lys Ser
    130              135              140

```

```

Leu Asn Ser Gly Pro Gln Cys
145              150

```

<210> 19
 <211> 30
 <212> ДНК
 <213> искусственная последовательность

<220>
 <223> прямой праймер cIL31NATf

<400> 19
 tacaccatgg cctccsacat ggctccaacg 30

<210> 20
 <211> 32
 <212> ДНК
 <213> искусственная последовательность

<220>
 <223> обратный праймер cIL31NATr

<400> 20
 cataactgcag ttactgcggt ccaactgttta ag 32

<210> 21
 <211> 138
 <212> БЕЛОК
 <213> искусственная последовательность

<220>
 <223> cIL-31/A

<400> 21

Met Ala Ser His Met Ala Pro Thr His Gln Leu Pro Pro Ser Asp Val
 1 5 10 15

Arg Lys Ile Ile Leu Glu Leu Gln Pro Leu Ser Arg Gly Leu Leu Glu
 20 25 30

Asp Tyr Gln Lys Lys Glu Thr Gly Val Pro Glu Ser Asn Arg Thr Leu
 35 40 45

Leu Leu Cys Leu Thr Ser Asp Ser Gln Pro Pro Arg Leu Asn Ser Ser
 50 55 60

Ala Ile Leu Pro Tyr Phe Arg Ala Ile Arg Pro Leu Ser Asp Lys Asn
 65 70 75 80

Ile Ile Asp Lys Ile Ile Glu Gln Leu Asp Lys Leu Lys Phe Gln His
 85 90 95

Glu Pro Glu Thr Glu Ile Ser Val Pro Ala Asp Thr Phe Glu Cys Lys
 100 105 110

Ser Phe Ile Leu Thr Ile Leu Gln Gln Phe Ser Ala Cys Leu Glu Ser

045381

115	120	125
Val Phe Lys Ser Leu Asn Ser Gly Pro Gln		
130	135	
<210> 22		
<211> 136		
<212> БЕЛОК		
<213> искусственная последовательность		
<220>		
<223> cIL31		
<400> 22		
Ser His Met Ala Pro Thr His Gln Leu Pro Pro Ser Asp Val Arg Lys		
1	5	10 15
Ile Ile Leu Glu Leu Gln Pro Leu Ser Arg Gly Leu Leu Glu Asp Tyr		
20	25	30
Gln Lys Lys Glu Thr Gly Val Pro Glu Ser Asn Arg Thr Leu Leu Leu		
35	40	45
Cys Leu Thr Ser Asp Ser Gln Pro Pro Arg Leu Asn Ser Ser Ala Ile		
50	55	60
Leu Pro Tyr Phe Arg Ala Ile Arg Pro Leu Ser Asp Lys Asn Ile Ile		
65	70	75 80
Asp Lys Ile Ile Glu Gln Leu Asp Lys Leu Lys Phe Gln His Glu Pro		
85	90	95
Glu Thr Glu Ile Ser Val Pro Ala Asp Thr Phe Glu Cys Lys Ser Phe		
100	105	110
Ile Leu Thr Ile Leu Gln Gln Phe Ser Ala Cys Leu Glu Ser Val Phe		
115	120	125
Lys Ser Leu Asn Ser Gly Pro Gln		
130	135	
<210> 23		
<211> 27		
<212> БЕЛОК		
<213> искусственная последовательность		
<220>		
<223> AK 2-28 SEQ ID NO: 1		
<400> 23		

Asp Lys Ser Glu Ser Thr Ser Ala Gly Arg Ser Arg Arg Arg Arg Pro
 1 5 10 15

Arg Arg Gly Ser Arg Ser Ala Pro Ser Ser Ala
 20 25

<210> 24
 <211> 10
 <212> ДНК
 <213> искусственная последовательность

<220>
 <223> палиндромный CpG

<400> 24
 gacgacgcgc

10

<210> 25
 <211> 150
 <212> БЕЛОК
 <213> искусственная последовательность

<220>
 <223> cIL-31-A/His6/TEV/C

<400> 25

Ala His His His His His His Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Ser His Met
 1 5 10 15

Ala Pro Thr His Gln Leu Pro Pro Ser Asp Val Arg Lys Ile Ile Leu
 20 25 30

Glu Leu Gln Pro Leu Ser Arg Gly Leu Leu Glu Asp Tyr Gln Lys Lys
 35 40 45

Glu Thr Gly Val Pro Glu Ser Asn Arg Thr Leu Leu Leu Cys Leu Thr
 50 55 60

Ser Asp Ser Gln Pro Pro Arg Leu Asn Ser Ser Ala Ile Leu Pro Tyr
 65 70 75 80

Phe Arg Ala Ile Arg Pro Leu Ser Asp Lys Asn Ile Ile Asp Lys Ile
 85 90 95

Ile Glu Gln Leu Asp Lys Leu Lys Phe Gln His Glu Pro Glu Thr Glu
 100 105 110

Ile Ser Val Pro Ala Asp Thr Phe Glu Cys Lys Ser Phe Ile Leu Thr
 115 120 125

Ile Leu Gln Gln Phe Ser Ala Cys Leu Glu Ser Val Phe Lys Ser Leu

045381

130	135	140
-----	-----	-----

Asn Ser Gly Pro Gln Cys
145 150

<210> 26
<211> 137
<212> БЕЛОК
<213> искусственная последовательность

<220>
<223> cIL-31/AoM

<400> 26

Ala Ser His Met Ala Pro Thr His Gln Leu Pro Pro Ser Asp Val Arg
1 5 10 15

Lys Ile Ile Leu Glu Leu Gln Pro Leu Ser Arg Gly Leu Leu Glu Asp
20 25 30

Tyr Gln Lys Lys Glu Thr Gly Val Pro Glu Ser Asn Arg Thr Leu Leu
35 40 45

Leu Cys Leu Thr Ser Asp Ser Gln Pro Pro Arg Leu Asn Ser Ser Ala
50 55 60

Ile Leu Pro Tyr Phe Arg Ala Ile Arg Pro Leu Ser Asp Lys Asn Ile
65 70 75 80

Ile Asp Lys Ile Ile Glu Gln Leu Asp Lys Leu Lys Phe Gln His Glu
85 90 95

Pro Glu Thr Glu Ile Ser Val Pro Ala Asp Thr Phe Glu Cys Lys Ser
100 105 110

Phe Ile Leu Thr Ile Leu Gln Gln Phe Ser Ala Cys Leu Glu Ser Val
115 120 125

Phe Lys Ser Leu Asn Ser Gly Pro Gln
130 135

<210> 27
<211> 150
<212> БЕЛОК
<213> искусственная последовательность

<220>
<223> cIL-31-His6/TEV

<400> 27

045381

Met Ala His His His His His His Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Ser His
1 5 10 15

Met Ala Pro Thr His Gln Leu Pro Pro Ser Asp Val Arg Lys Ile Ile
20 25 30

Leu Glu Leu Gln Pro Leu Ser Arg Gly Leu Leu Glu Asp Tyr Gln Lys
35 40 45

Lys Glu Thr Gly Val Pro Glu Ser Asn Arg Thr Leu Leu Leu Cys Leu
50 55 60

Thr Ser Asp Ser Gln Pro Pro Arg Leu Asn Ser Ser Ala Ile Leu Pro
65 70 75 80

Tyr Phe Arg Ala Ile Arg Pro Leu Ser Asp Lys Asn Ile Ile Asp Lys
85 90 95

Ile Ile Glu Gln Leu Asp Lys Leu Lys Phe Gln His Glu Pro Glu Thr
100 105 110

Glu Ile Ser Val Pro Ala Asp Thr Phe Glu Cys Lys Ser Phe Ile Leu
115 120 125

Thr Ile Leu Gln Gln Phe Ser Ala Cys Leu Glu Ser Val Phe Lys Ser
130 135 140

Leu Asn Ser Gly Pro Gln
145 150

<210> 28
<211> 149
<212> БЕЛОК
<213> искусственная последовательность

<220>
<223> cIL-31-A/His6/TEV

<400> 28

Ala His His His His His His Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Ser His Met
1 5 10 15

Ala Pro Thr His Gln Leu Pro Pro Ser Asp Val Arg Lys Ile Ile Leu
20 25 30

Glu Leu Gln Pro Leu Ser Arg Gly Leu Leu Glu Asp Tyr Gln Lys Lys
35 40 45

Glu Thr Gly Val Pro Glu Ser Asn Arg Thr Leu Leu Leu Cys Leu Thr

045381

50 55 60

Ser Asp Ser Gln Pro Pro Arg Leu Asn Ser Ser Ala Ile Leu Pro Tyr
65 70 75 80

Phe Arg Ala Ile Arg Pro Leu Ser Asp Lys Asn Ile Ile Asp Lys Ile
85 90 95

Ile Glu Gln Leu Asp Lys Leu Lys Phe Gln His Glu Pro Glu Thr Glu
100 105 110

Ile Ser Val Pro Ala Asp Thr Phe Glu Cys Lys Ser Phe Ile Leu Thr
115 120 125

Ile Leu Gln Gln Phe Ser Ala Cys Leu Glu Ser Val Phe Lys Ser Leu
130 135 140

Asn Ser Gly Pro Gln
145

<210> 29
<211> 139
<212> БЕЛОК
<213> искусственная последовательность

<220>
<223> cIL-31/A/C

<400> 29

Met Ala Ser His Met Ala Pro Thr His Gln Leu Pro Pro Ser Asp Val
1 5 10 15

Arg Lys Ile Ile Leu Glu Leu Gln Pro Leu Ser Arg Gly Leu Leu Glu
20 25 30

Asp Tyr Gln Lys Lys Glu Thr Gly Val Pro Glu Ser Asn Arg Thr Leu
35 40 45

Leu Leu Cys Leu Thr Ser Asp Ser Gln Pro Pro Arg Leu Asn Ser Ser
50 55 60

Ala Ile Leu Pro Tyr Phe Arg Ala Ile Arg Pro Leu Ser Asp Lys Asn
65 70 75 80

Ile Ile Asp Lys Ile Ile Glu Gln Leu Asp Lys Leu Lys Phe Gln His
85 90 95

Glu Pro Glu Thr Glu Ile Ser Val Pro Ala Asp Thr Phe Glu Cys Lys
100 105 110

Ser Phe Ile Leu Thr Ile Leu Gln Gln Phe Ser Ala Cys Leu Glu Ser
 115 120 125

Val Phe Lys Ser Leu Asn Ser Gly Pro Gln Cys
 130 135

<210> 30

<211> 138

<212> БЕЛОК

<213> искусственная последовательность

<220>

<223> cIL-31/AoM/C

<400> 30

Ala Ser His Met Ala Pro Thr His Gln Leu Pro Pro Ser Asp Val Arg
 1 5 10 15

Lys Ile Ile Leu Glu Leu Gln Pro Leu Ser Arg Gly Leu Leu Glu Asp
 20 25 30

Tyr Gln Lys Lys Glu Thr Gly Val Pro Glu Ser Asn Arg Thr Leu Leu
 35 40 45

Leu Cys Leu Thr Ser Asp Ser Gln Pro Pro Arg Leu Asn Ser Ser Ala
 50 55 60

Ile Leu Pro Tyr Phe Arg Ala Ile Arg Pro Leu Ser Asp Lys Asn Ile
 65 70 75 80

Ile Asp Lys Ile Ile Glu Gln Leu Asp Lys Leu Lys Phe Gln His Glu
 85 90 95

Pro Glu Thr Glu Ile Ser Val Pro Ala Asp Thr Phe Glu Cys Lys Ser
 100 105 110

Phe Ile Leu Thr Ile Leu Gln Gln Phe Ser Ala Cys Leu Glu Ser Val
 115 120 125

Phe Lys Ser Leu Asn Ser Gly Pro Gln Cys
 130 135

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Применение композиции в способе профилактики или лечения атопического дерматита собак (АДС) у животных семейства псовых, причем эффективное количество указанной композиции вводят указанным животным семейства псовых, и указанная композиция содержит

(а) коровую частицу с по меньшей мере одним первым сайтом присоединения, где указанная коровая частица представляет собой вирусоподобную частицу (VLP); и

(b) по меньшей мере один антиген собачьего интерлейкина-31 (антиген cIL-31) с по меньшей мере одним вторым сайтом присоединения, причем указанный антиген cIL-31 содержит белок с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 22 или белок с аминокислотной последовательностью, обладающей по меньшей мере 90% идентичностью аминокислотной последовательности по отношению к SEQ ID NO: 22;

причем (а) и (b) связаны через указанный по меньшей мере один первый и указанный по меньшей мере один второй сайт присоединения посредством по меньшей мере одной непептидной ковалентной связи.

2. Применение композиции по п.1, отличающееся тем, что указанное животное семейства псовых представляет собой домашнюю собаку.

3. Применение композиции по п.1, отличающееся тем, что указанная аминокислотная последовательность обладает по меньшей мере 92%, предпочтительно по меньшей мере 95% и более предпочтительно по меньшей мере 98% идентичностью аминокислотной последовательности по отношению к SEQ ID NO: 22.

4. Применение композиции по п.1, отличающееся тем, что указанная VLP представляет собой рекомбинантную VLP.

5. Применение композиции по п.4, отличающееся тем, что указанная VLP происходит от вируса растения.

6. Применение композиции по любому из пп.4, 5, отличающееся тем, что указанная VLP представляет собой модифицированную VLP, содержащую, по существу состоящую или, в альтернативном случае, состоящую из по меньшей мере одного модифицированного полипептида VLP, причем указанный модифицированный полипептид VLP содержит или, предпочтительно, состоит из

(а) полипептида VLP и

(b) эпитопа Т-хелпера,

причем указанный полипептид VLP содержит или, предпочтительно, состоит из

(i) аминокислотной последовательности белка оболочки вируса, предпочтительно аминокислотной последовательности белка оболочки вируса растения, или

(ii) мутированной аминокислотной последовательности, причем аминокислотная последовательность, которую мутируют, представляет собой аминокислотную последовательность указанного белка оболочки вируса, и указанная мутированная аминокислотная последовательность и указанный белок оболочки вируса демонстрируют идентичность последовательности, составляющую по меньшей мере 90%, предпочтительно по меньшей мере 95%, более предпочтительно по меньшей мере 98% и еще более предпочтительно по меньшей мере 99%.

7. Применение композиции по любому из пп.4-6, отличающееся тем, что указанная VLP представляет собой модифицированную VLP вируса мозаики огурца (CMV), причем указанная модифицированная VLP CMV содержит, по существу состоит или, в альтернативном случае, состоит из по меньшей мере одного модифицированного полипептида CMV, причем указанный модифицированный полипептид CMV содержит или, предпочтительно, состоит из

(а) полипептида CMV и

(b) эпитопа Т-хелпера; и

причем указанный полипептид CMV содержит или, предпочтительно, состоит из

(i) аминокислотной последовательности белка оболочки CMV; или

(ii) мутированной аминокислотной последовательности, причем аминокислотная последовательность, которую мутируют, представляет собой аминокислотную последовательность белка оболочки CMV, и указанная мутированная аминокислотная последовательность и указанный белок оболочки CMV демонстрируют идентичность последовательности, составляющую по меньшей мере 90%, предпочтительно по меньшей мере 95%, более предпочтительно по меньшей мере 98% и еще более предпочтительно по меньшей мере 99%.

8. Применение композиции по п.7, отличающееся тем, что указанный полипептид CMV содержит или, предпочтительно, состоит из

(а) аминокислотной последовательности белка оболочки CMV, причем указанная аминокислотная последовательность содержит или, предпочтительно, состоит из SEQ ID NO: 1, или

(b) аминокислотной последовательности, обладающей по меньшей мере 90% идентичностью последовательности по отношению к SEQ ID NO: 1; и

причем указанная аминокислотная последовательность, определенная в (а) или (b), содержит SEQ ID NO: 23; или

указанная аминокислотная последовательность, определенная в (а) или (b), содержит область аминокислотной последовательности, причем указанная область аминокислотной последовательности обладает по меньшей мере 90% идентичностью последовательности по отношению к SEQ ID NO: 23.

9. Применение композиции по любому из пп.7, 8, отличающееся тем, что указанный эпитоп Т-хелпера замещает N-концевую область указанного полипептида CMV, причем указанная N-концевая область указанного полипептида CMV соответствует 2-12 аминокислотам SEQ ID NO: 1.

10. Применение композиции по любому из пп.7-9, отличающееся тем, что указанный эпитоп Th-клетки представляет собой последовательность PADRE, причем указанный эпитоп Th-клетки содержит, предпочтительно состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5; или указанный эпитоп Th-клетки происходит от столбнячного токсина, причем указанный эпитоп Th-клетки содержит, предпочтительно состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4.

11. Применение композиции по любому из пп.7-10, отличающееся тем, что указанный полипептид CMV содержит или, предпочтительно, состоит из аминокислотной последовательности белка оболочки CMV, причем указанная аминокислотная последовательность содержит или, предпочтительно, состоит из SEQ ID NO: 1, или аминокислотной последовательности, обладающей идентичностью последовательности по меньшей мере 95% по отношению к SEQ ID NO: 1; причем указанная аминокислотная последовательность содержит SEQ ID NO: 23; и указанный эпитоп Т-хелпера замещает N-концевую область указанного полипептида CMV, причем указанная замещенная N-концевая область указанного полипептида CMV состоит из 11-13 последовательных аминокислот, предпочтительно - 11 последовательных аминокислот, и, более предпочтительно, указанная N-концевая область указанного полипептида CMV соответствует 2-12 аминокислотам SEQ ID NO: 1.

12. Применение композиции по любому из пп.7-11, отличающееся тем, что указанный модифицированный полипептид CMV содержит, предпочтительно состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 7.

13. Применение композиции по любому из предшествующих пунктов, отличающееся тем, что указанный по меньшей мере один антиген cIL-31 содержит или, предпочтительно, состоит из белка с аминокислотной последовательностью, выбранной из:

- (a) SEQ ID NO: 18;
- (b) SEQ ID NO: 21;
- (c) SEQ ID NO: 22 или
- (d) SEQ ID NO: 26.

14. Применение композиции по любому из предшествующих пунктов, отличающееся тем, что указанное введение указанной композиции снижает по меньшей мере один параметр или симптом АДС по сравнению с указанным по меньшей мере одним параметром или симптомом АДС до указанного введения, причем, предпочтительно, указанный по меньшей мере один параметр или симптом АДС представляет собой уровень или степень тяжести поражений кожи или зуда, и, более предпочтительно, указанное снижение указанного уровня или степени тяжести поражений кожи определяют путем теста балльной оценки симптома и поражения.

15. Композиция, содержащая

- (a) вирусоподобную частицу (VLP) с по меньшей мере одним первым сайтом присоединения;
- (b) по меньшей мере один антиген собачьего интерлейкина-31 (антиген cIL-31) с по меньшей мере одним вторым сайтом присоединения, причем указанный антиген cIL-31 содержит белок с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 22 или белок с аминокислотной последовательностью, обладающей по меньшей мере 90% идентичностью аминокислотной последовательности по отношению к SEQ ID NO: 22;

причем (a) и (b) связаны через указанный по меньшей мере один первый и указанный по меньшей мере один второй сайт присоединения посредством по меньшей мере одной непептидной ковалентной связи.

16. Композиция по п.15, отличающаяся тем, что указанная аминокислотная последовательность обладает по меньшей мере 92%, предпочтительно по меньшей мере 95% и более предпочтительно по меньшей мере 98% идентичностью аминокислотной последовательности по отношению к SEQ ID NO: 22.

17. Композиция по п.15, отличающаяся тем, что указанная VLP представляет собой модифицированную VLP вируса мозаики огурца (CMV), причем указанный модифицированный полипептид CMV содержит, предпочтительно состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 7.

18. Композиция по любому из пп.15-17, отличающаяся тем, что указанный второй сайт присоединения представляет собой сульфгидрильную группу, причем, предпочтительно, указанная сульфгидрильная группа получена в результате реакции указанного антигена cIL-31 с N-сукцинимидил-S-ацетилтиоацетатом (SATA) и при этом, предпочтительно, указанный по меньшей мере один антиген cIL-

31 содержит или, предпочтительно, состоит из белка с аминокислотной последовательностью, выбранной из:

- (a) SEQ ID NO: 18;
- (b) SEQ ID NO: 21;
- (c) SEQ ID NO: 22 или
- (d) SEQ ID NO: 26.

19. Способ профилактики или лечения атопического дерматита собак (АДС) у животных семейства псовых, причем эффективное количество композиции вводят указанным животным семейства псовых, и указанная композиция содержит

(a) коровую частицу с по меньшей мере одним первым сайтом присоединения, где указанная коровая частица представляет собой вирусоподобную частицу (VLP); и

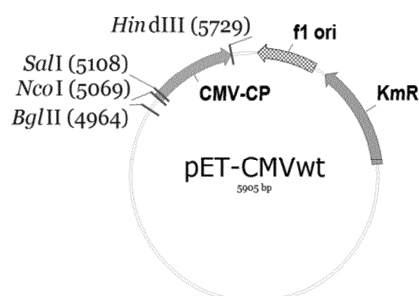
(b) по меньшей мере один антиген собачьего интерлейкина-31 (антиген cIL-31) с по меньшей мере одним вторым сайтом присоединения, причем указанный антиген cIL-31 содержит белок с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 22 или белок с аминокислотной последовательностью, обладающей по меньшей мере 90% идентичностью аминокислотной последовательности по отношению к SEQ ID NO: 22;

причем (a) и (b) связаны через указанный по меньшей мере один первый и указанный по меньшей мере один второй сайт присоединения посредством по меньшей мере одной непептидной ковалентной связи.

20. Способ по п.19, отличающийся тем, что указанное животное семейства псовых представляет собой домашнюю собаку.

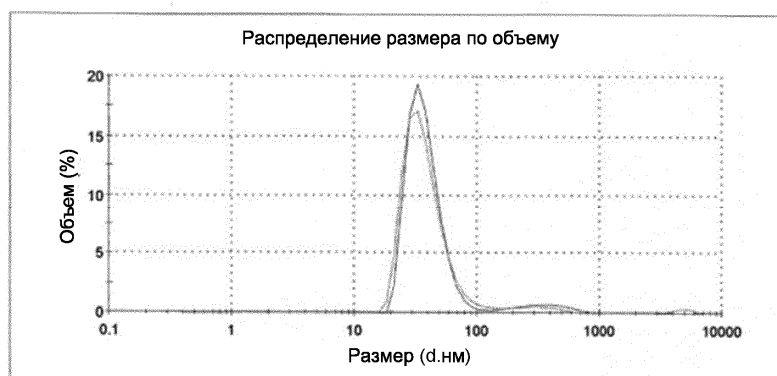
21. Способ по п.19, отличающийся тем, что указанная аминокислотная последовательность обладает по меньшей мере 92%, предпочтительно по меньшей мере 95% и более предпочтительно по меньшей мере 98% идентичностью аминокислотной последовательности по отношению к SEQ ID NO: 22.

22. Способ по п.19, отличающийся тем, что указанная композиция или указанное введение указанной композиции являются такими, как определено по любому из пп.4-14.



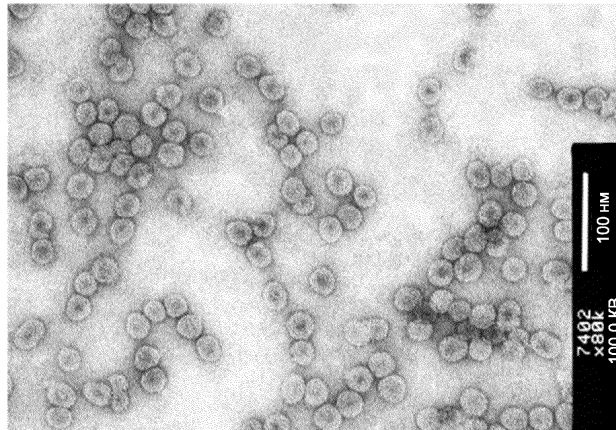
Фиг. 1

	Размер (д.нм...	Объем (%)	Ширина (д.н...
Z-среднее (д.нм): 80,92	Пик 1: 39,03	95,0	18,97
Pdl: 0,434	Пик 2: 307,8	3,9	117,9
Отсекаемый отрезок: 0,943	Пик 3: 4674	1,2	924,9
Качество результатов: Хорошее			

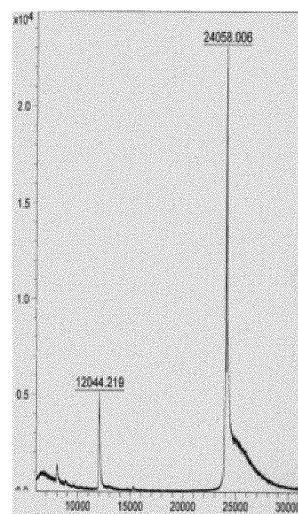


Фиг. 2А

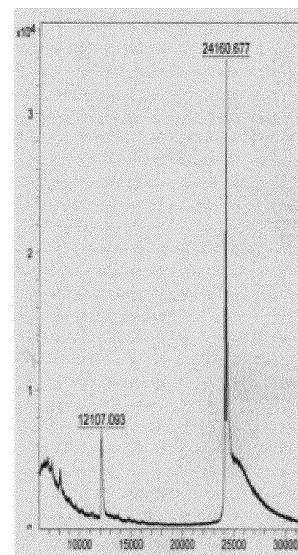
045381



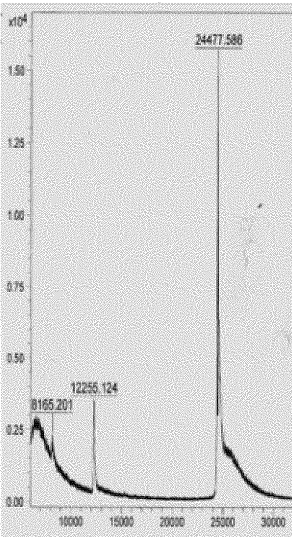
Фиг. 2В



Фиг. 3А

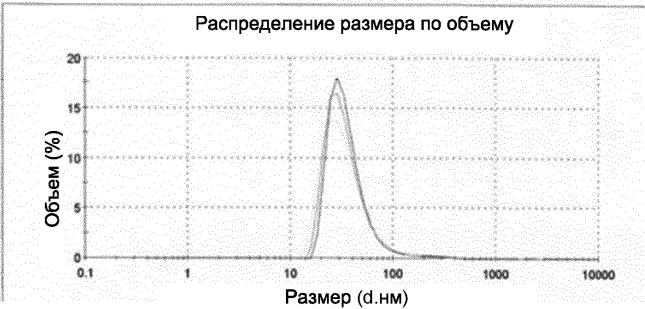


Фиг. 3В

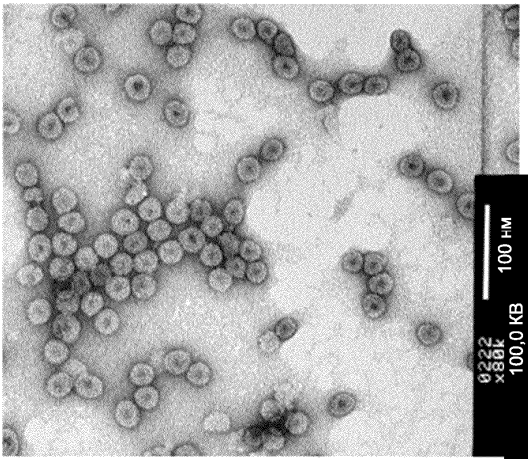


Фиг. 3С

	Размер (d.нм...	Объем (%)	Ширина (d.н...
Z-среднее (d.нм): 64,70	Пик 1: 37,94	100,0	31,19
Pdl: 0,275	Пик 2: 0,000	0,0	0,000
Отсекаемый отрезок: 0,945	Пик 3: 0,000	0,0	0,000
Качество результатов: Хорошее			



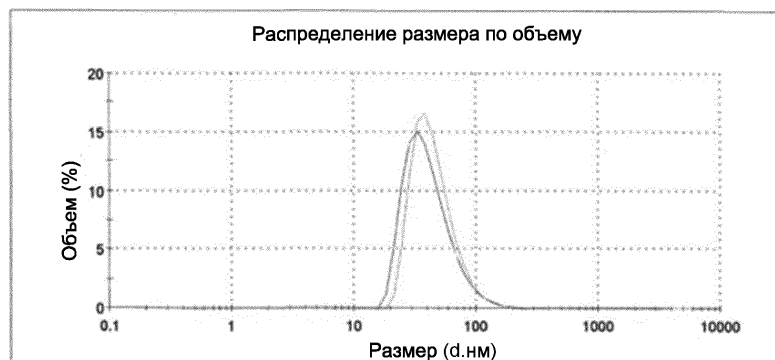
Фиг. 4А



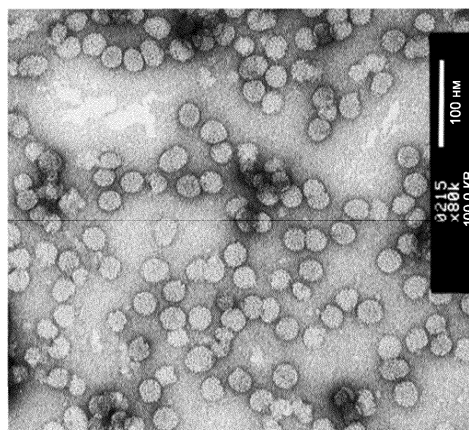
Фиг. 4В

045381

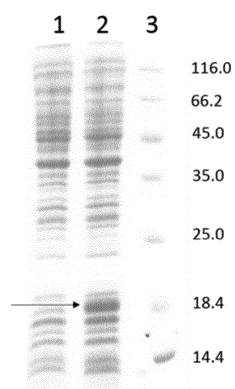
	Размер (д.нм...	Объем (%)	Ширина (д.н...
Z-среднее (д.нм): 61,86	Пик 1: 45,98	99,5	20,78
Pdl: 0,185	Пик 2: 4448	0,5	992,6
Отсекаемый отрезок: 0,959	Пик 3: 0,000	0,0	0,000
Качество результатов: Хорошее			



Фиг. 5A

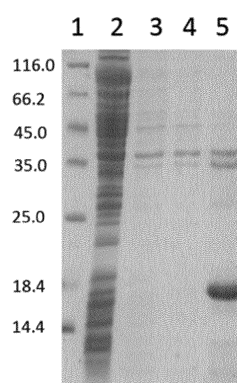


Фиг. 5B

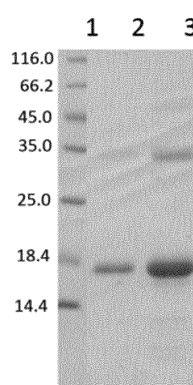


Фиг. 6

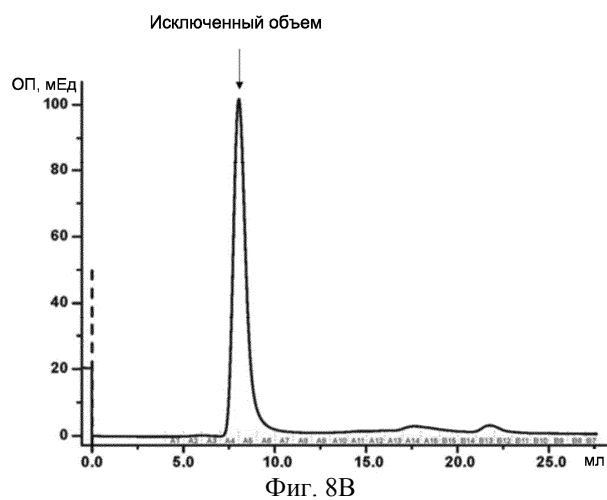
045381



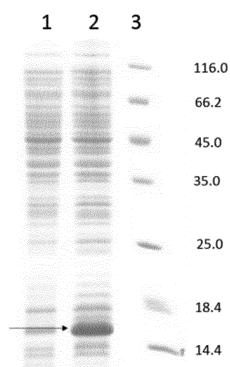
Фиг. 7



Фиг. 8А

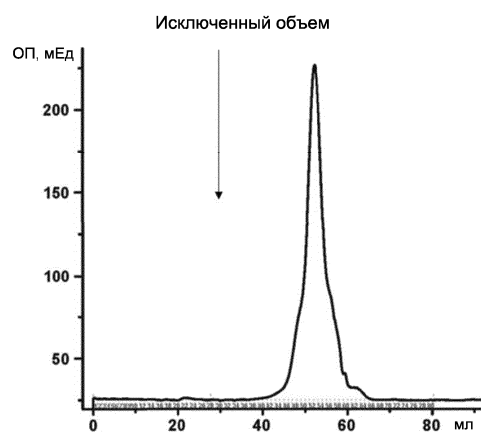


Фиг. 8В

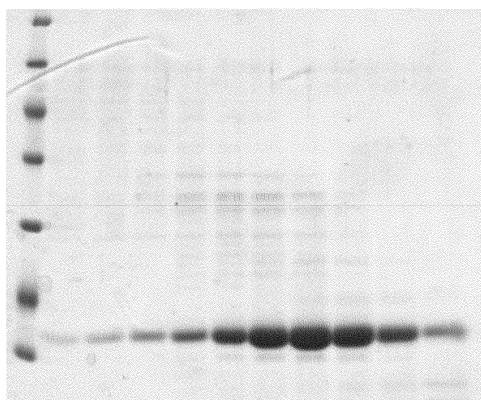


Фиг. 9

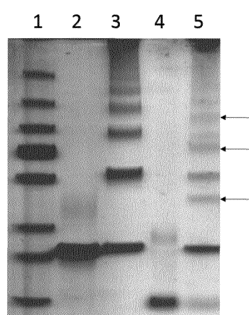
045381



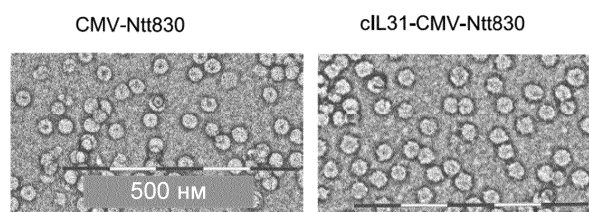
Фиг. 10А



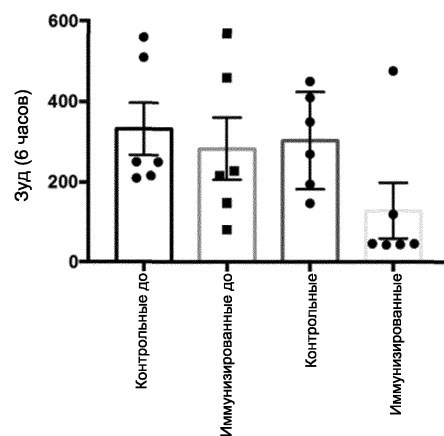
Фиг. 10В



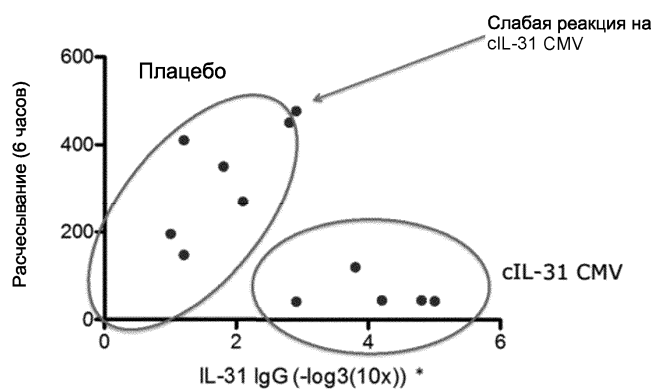
Фиг. 11



Фиг. 12



Фиг. 13А



Фиг. 13В

