

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **023058**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2016.04.29

(51) Int. Cl. *A61K 39/145* (2006.01)

(21) Номер заявки
201290675

(22) Дата подачи заявки
2011.01.21

(54) **ВАКЦИННЫЕ ВЕКТОРЫ И СПОСОБЫ УСИЛЕНИЯ ИММУННЫХ ОТВЕТОВ**

(31) **61/297,098**

(56) **US-A1-20030165538**

(32) **2010.01.21**

US-A1-20080305120

(33) **US**

WO-A2-2008036675

(43) **2013.04.30**

US-A1-20080069821

(86) **PCT/US2011/022062**

US-A1-20080004207

(87) **WO 2011/091255 2011.07.28**

ROVERE-QUERINI et al., HMGB1 is an endogenous immune adjuvant released by necrotic cells. EMBO Rep, August 2004, vol 5, No 8, pp 825-830. Entire document

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ДЗЕ БОРД ОФ ТРАСТИЗ ОФ ДЗЕ
ЮНИВЕРСИТИ ОФ АРКАНЗАС;
ДЗЕ ТЕКСАС Эй ЭНД Эм
ЮНИВЕРСИТИ СИСТЕМ (US)**

(72) Изобретатель:
**Бергман Люк, Боттдж Уолтер,
Харджис Билли, Лейтон Шеррил
(US)**

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

(57) В изобретении представлены вакцинные векторы, включающие антигенный полипептид и полипептид HMGB1, которые присутствуют на поверхности вакцинного вектора. Композиции, включающие вакцинные векторы, также представляются и включают фармацевтически приемлемый носитель, соответственно носитель для орального или интраназального введения. Также представлены способы усиления иммунных ответов, в частности гуморального иммунного ответа и соответственно продукции IgA, посредством введения субъекту вакцинных векторов или композиций, раскрытых в изобретении.

B1

023058

023058

B1

Перекрестная ссылка на родственные заявки

Эта заявка на патент притязает на приоритет предварительной заявки на патент США № 61/297098, поданной 21 января 2010 г., которая включена сюда посредством ссылки в ее полном объеме.

Введение

Вакцины используются для вызова адаптивного иммунного ответа против антигенов, в частности антигенов патогенов, опухолевых клеток или т.п., для уменьшения интенсивности или предотвращения заболевания. Синтетические пептиды или вакцины на основе убитых или аттенуированных микроорганизмов являются часто эффективными в стимулировании сильного иммунного ответа, который является полностью протективным. В некоторых случаях эти вакцины не являются протективными или являются лишь частично протективными, и другие стратегии должны применяться для разработки протективных вакцин. Вакцины на основе аттенуированных микроорганизмов также связаны с рисками переноса генов или исправления мутаций и могут представлять риск для индивидуумов с ослабленным иммунитетом. Необходима разработка новых вакцин, которые являются безопасными и эффективными в стимулировании длительных протективных иммунных ответов.

Инфицирование вирусом гриппа, в частности вирусом птичьего гриппа H5N1, представляет собой растущую проблему в области здравоохранения и экономики. Факты явно указывают на то, что H5N1 продолжает циркулировать между чувствительными птицами и свиньями в расширяющихся областях всего мира. Многие ученые полагают, что в случае оставления без сдерживания существующий сегодня вирус птичьего гриппа H5N1 мутирует с созданием возможности для передачи от человека к человеку и вызовом всемирной пандемии. При коэффициенте смертности, превышающем 50%, такое появление эпидемии будет ужасающим. Независимо от способности вируса к вызову заболевания у человека вирус птичьего гриппа H5N1 уже угрожает большим ударом по экономике вследствие уничтожения стай домашних птиц в пораженных областях. Поэтому необходима разработка вакцины для защиты людей, домашней птицы, свиней и других одомашненных животных от вируса гриппа H5N1. Вакцина против гриппа, которая способна защитить от H5N1, а также от других вирусов гриппа, таких как H1N1, будет оптимальной.

Краткое изложение сущности изобретения

Здесь предоставляются вакцинные векторы, способы стимулирования иммунного ответа и способы снижения заболеваемости, связанной с инфицированием вирусом гриппа. В одном аспекте предоставляется вакцинный вектор, включающий антигенный полипептид и полипептид HMGB1 или его функциональный фрагмент. По крайней мере часть антигенного полипептида и по крайней мере полипептида HMGB1 присутствуют на поверхности вакцинного вектора. Вакцинный вектор может включать первый полинуклеотид, кодирующий антигенный полипептид, и второй полинуклеотид, кодирующий полипептид HMGB1. Полипептид HMGB1 и антигенный полипептид могут быть связаны, например, в гибридном белке. Как полипептид HMGB1, так и антигенный полипептид могут быть вставлены в поверхностный петлевой участок трансмембранного белка.

В другом аспекте предоставляется композиция, включающая вакцинный вектор и фармацевтически приемлемый носитель. Фармацевтически приемлемый носитель может быть приемлемым для орального или интраназального применения. Вакцинный вектор может быть не способен к репликации.

В еще одном аспекте предоставляется вакцинный вектор *Bacillus spp.* Вакцинный вектор включает первую полинуклеотидную последовательность, кодирующую антигенный полипептид, представляемый на поверхности вакцинного вектора, и вторую полинуклеотидную последовательность, кодирующую иммуностимулирующий полипептид, представляемый на поверхности вакцинного вектора. Антигенным полипептидом может быть полипептид M2e вируса гриппа, полипептид HA вируса гриппа или полипептид NP вируса гриппа или их комбинация. Иммуностимулирующим полипептидом может быть полипептид CD154 или полипептид HMGB1 или их комбинация. Иммуностимулирующий полипептид и антигенный полипептид могут быть связаны, например, в гибридном белке, и могут быть включены в поверхностный петлевой участок трансмембранного белка.

Те не менее, в другом аспекте предоставляются способы усиления иммунного ответа у субъекта. В этом способе предоставляемые здесь вакцинные векторы или композиции вводят субъекту в количестве, эффективном для усиления иммунного ответа у субъекта против антигенного полипептида. Соответственно, когда вакцинный вектор вводят орально или интраназально.

В дальнейшем аспекте предоставляются способы усиления иммунного ответа у субъекта посредством введения вакцинного вектора *Bacillus spp.*, описываемого здесь. Вакцинный вектор включает первую полинуклеотидную последовательность, кодирующую антигенный полипептид, представляемый на поверхности вакцинного вектора, и вторую полинуклеотидную последовательность, кодирующую иммуностимулирующий полипептид, представляемый на поверхности вакцинного вектора. Антигенным полипептидом может быть полипептид M2e вируса гриппа, полипептид HA вируса гриппа, полипептид NP вируса гриппа или их комбинация. Иммуностимулирующим полипептидом может быть полипептид CD154, полипептид HMGB1 или их комбинация.

Те не менее, в дальнейшем аспекте предоставляются способы снижения связанной с вирусом гриппа заболеваемости у субъекта. В этих способах введение раскрытых здесь вакцинных векторов или ком-

позиций снижает заболеваемость, связанную с последующим инфицированием вирусом гриппа.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1 представляет собой диаграмму, на которой представлены отношения S/P (образца к положительному контролю), полученные в ELISA для продукции специфичных для M2e антител цыплятами после орального введения через зонд указанной дозы вакцинного вектора *Bacillus subtilis*, экспрессирующего эпитопы белков вируса гриппа А и либо НМGB1, либо CD154, по сравнению с цыплятами, вакцинированными солевым раствором.

Фиг. 2 представляет собой диаграмму, на которой представлены отношения S/P, полученные в ELISA для продукции специфичных для HALB антител цыплятами после орального введения через зонд указанной дозы вакцинного вектора *Bacillus subtilis*, экспрессирующего эпитопы белков вируса гриппа А и либо НМGB1, либо CD154, по сравнению с цыплятами, вакцинированными солевым раствором.

Фиг. 3 представляет собой диаграмму, на которой представлены отношения S/P, полученные в ELISA для продукции специфичных для HAUA антител цыплятами после орального введения через зонд указанной дозы вакцинного вектора *Bacillus subtilis*, экспрессирующего эпитопы белков вируса гриппа А и либо НМGB1, либо CD154, по сравнению с цыплятами, вакцинированными солевым раствором.

Фиг. 4 представляет собой диаграмму, на которой представлены отношения S/P, полученные в ELISA для продукции специфичных для M2e антител цыплятами после орального введения через зонд указанной дозы живых или различных образом инактивированных вакцинных векторов *Bacillus subtilis*, экспрессирующих эпитопы белков вируса гриппа А и либо НМGB1, либо CD154, по сравнению с цыплятами, вакцинированными лишь *Bacillus* вектором (BSBB).

Фиг. 5 представляет собой диаграмму, на которой представлены отношения S/P, полученные в ELISA для продукции специфичных для HALB антител цыплятами после орального введения через зонд указанной дозы живых или различных образом инактивированных вакцинных векторов *Bacillus subtilis*, экспрессирующих эпитопы белков вируса гриппа А и либо НМGB1, либо CD154, по сравнению с цыплятами, вакцинированными лишь *Bacillus* вектором (BSBB).

Фиг. 6 представляет собой диаграмму, на которой представлены отношения S/P, полученные в ELISA для продукции специфичных для HAUA антител цыплятами после орального введения через зонд указанной дозы живых или различных образом инактивированных вакцинных векторов *Bacillus subtilis*, экспрессирующих эпитопы белков вируса гриппа А и либо НМGB1, либо CD154, по сравнению с цыплятами, вакцинированными лишь *Bacillus* вектором (BSBB).

Фиг. 7 представляет собой диаграмму, на которой представлены отношения S/P, полученные в ELISA для продукции специфичных для M2e антител класса IgG цыплятами после орального введения через зонд либо 10^6 живых, либо различных указанных доз инактивированных формалином вакцинных векторов *Bacillus subtilis*, экспрессирующих эпитопы белков вируса гриппа А и НМGB1, по сравнению с цыплятами, вакцинированными лишь *Bacillus* вектором (BSBB).

Фиг. 8 представляет собой диаграмму, на которой представлены отношения S/P, полученные в ELISA для продукции специфичных для M2e антител класса IgA цыплятами, вакцинированными либо орально, либо подкожно, 10^6 живых, инактивированных формалином или инактивированных формалином и лиофилизированных вакцинных векторов *Bacillus subtilis*, экспрессирующих эпитопы белков вируса гриппа А и НМGB1, по сравнению с цыплятами, вакцинированными лишь *Bacillus* вектором (BSBB).

Фиг. 9 представляет собой диаграмму, на которой представлены отношения S/P, полученные в ELISA для продукции специфичных для M2e антител класса IgA цыплятами, вакцинированными либо орально, либо подкожно, 10^6 живых, инактивированных формалином или инактивированных формалином и лиофилизированных вакцинных векторов *Bacillus subtilis*, экспрессирующих эпитопы белков вируса гриппа А и НМGB1, по сравнению с цыплятами, вакцинированными лишь *Bacillus* вектором (BSBB).

Подробное описание настоящего изобретения

Технологии рекомбинантных ДНК обеспечивают возможность для относительно легкой манипуляции многими бактериальными и вирусными видами. Некоторые бактерии и вирусы либо являются по своей природе малопатогенными или непатогенными, но остаются способными к вызову сильного иммунного ответа, либо их можно подвергнуть отбору на такое свойство или создать такими. Эти бактерии и вирусы порождают привлекательные вакцинные векторы для вызова иммунного ответа против гетерологичных или чужеродных антигенов. Бактериальные или вирусные вакцинные векторы могут имитировать природную инфекцию и вызывать сильный и длительно сохраняемый иммунитет. Часто производство и введение вакцинных векторов являются относительно недорогими. Кроме того, такие векторы могут часто содержать более одного антигена и могут обеспечить защиту от множества инфекционных агентов.

Вакцинные векторы в виде живых бактерий или вирусов могут, тем не менее, представлять риск для индивидуумов с ослабленным иммунитетом и в их случае требуется дополнительное регулятивное рассмотрение. Поэтому желательным является применение векторов, которые являются убийными или инактивируемыми или квалтифицируются как организмы, которые обычно считаются безопасными (GRAS), Управлением по контролю за продуктами и лекарствами (FDA). Проблемой является вызов сильного иммунного ответа, используя такие векторы. Как продемонстрировано в примерах, посред-

вом размещения полипептидов HMGB1 (амфотеринов, белков B1 из группы белков с высокой подвижностью) на поверхности вакцинного вектора авторы настоящего изобретения могут вызвать сильный иммунный ответ против антигенных полипептидов, используя вектор *Bacillus spp.* На самом деле, в примерах демонстрируется, что этот вектор можно подвергнуть инактивации, так что он не может реплицироваться, используя множество способов, и, тем не менее, может вызывать сильный иммунный ответ после введения.

Здесь предоставляются вакцинные векторы, включающие антигенный полипептид и полипептид HMGB1 или его функциональный фрагмент. По крайней мере часть антигенного полипептида и по крайней мере часть полипептида HMGB1 или его функционального фрагмента присутствуют на поверхности вакцинного вектора. Вакцинный вектор может включать первый полинуклеотид, кодирующий антигенный полипептид, и второй полинуклеотид, кодирующий полипептид HMGB1. Полипептид HMGB1 и антигенный полипептид могут быть связаны, например, в гибридном белке, или могут экспрессироваться по отдельности. Как полипептид HMGB1, так и антигенный полипептид могут быть включены в поверхностный петлевой участок трансмембранного белка.

Вакцинные векторы могут быть бактериальными, вирусными векторами или векторами на основе липосом. Потенциальные вакцинные векторы включают, но без ограничения, *Bacillus* (*Bacillus subtilis*), *Salmonella* (*Salmonella enteritidis*), *Shigella*, *Escherichia* (*E. coli*), *Yersinia*, *Bordetella*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Vibrio* (*Vibrio cholerae*), *Listeria*, аденовирус, поксвирус, вирус герпеса, альфавирус и аденоассоциированный вирус. Соответственно, когда вакцинным вектором является GRAS организм, вакцинный вектор может быть инактивированным или убитым, так что он не способен к репликации. Способы инактивации или убивания бактериальных или вирусных вакцинных векторов известны квалифицированным в данной области техники специалистам и включают, но без ограничения, такие способы, как те, которые приведены в примерах, т.е. инактивацию формалином, основанную на антибиотиках инактивацию, термическую обработку и обработку этанолом.

Антигенным полипептидом является полипептид, который может специфически распознать адаптивная иммунная система. Антигенный полипептид включает любой полипептид, который является иммуногенным. Антигенные полипептиды включают, но без ограничения, антигены, которые относятся к патогенам, относятся к аллергенам, опухолям или связаны с заболеванием. Патогены включают вирусные, паразитические, грибковые и бактериальные патогены, а также белки-патогены, такие как прионы. Антигенными полипептидами могут быть полноразмерные белки или их части. Хорошо известно, что распознавание иммунной системой многих белков основано на относительно небольшом числе аминокислот, часто называемом эпитопом. Эпитопы могут представлять собой лишь 8-10 аминокислот. Таким образом, описываемые здесь антигенные полипептиды могут представлять собой полноразмерные белки, эпитопы длиной 8 аминокислот или любой участок между этими пределами. В действительности, антигенные полипептиды могут включать более одного эпитопа одиночного патогена или белка.

В вакцинный вектор могут быть включено множество копий одного и того же эпитопа или множество эпитопов различных белков. Предусматривается, что несколько эпитопов или антигенов, связанных с одним и тем же патогеном или заболеванием или различными патогенами или заболеваниями, могут вводиться вместе в одном вакцинном векторе для вызова усиленного иммунного ответа против множества антигенов. Рекомбинантные вакцинные векторы могут кодировать антигены множества патогенных микроорганизмов, вирусов или опухолевоспецифических антигенов. Введение вакцинных векторов, способных экспрессировать множество антигенов, способствует вызову иммунитета к двум или более заболеваниям в одно и то же время.

Антигенным полипептидом может быть полипептид вируса гриппа соответственно, когда им является полипептид вируса гриппа штамма H5N1 или полипептид, ассоциируемый с множеством штаммов вируса гриппа, такой как полипептид белка M2 вируса гриппа. Эктодомен белка M2 вируса гриппа A, известный как M2e, выпячивается с поверхности вируса. M2e - часть белка M2 содержит приблизительно 24 аминокислоты. Полипептид M2e незначительно варьируют от одного изолята к другому изоляту вируса гриппа. На самом деле, лишь несколько встречающихся в природе мутаций в M2e было обнаружено в изолятах от инфицированных людей с момента эпидемии гриппа в 1918. Кроме того, вирусы гриппы, выделенные из организмов-носителей, являющихся птицами и свиньями, имеют различные, однако консервативные, последовательности M2e. Для просмотра последовательностей полипептидов M2e, выделенных из организмов-носителей, являющихся людьми, птицами и свиньями, см. Liu et al., *Microbes and Infection* 7: 171-177 (2005) и Reid et al., *J. Virol.* 76: 10717-10723 (2002), каждый из которых включен сюда посредством ссылки в его полном объеме (см. также SEQ ID NO: 1-4).

Соответственно, когда весь полипептид M2e включают в вакцинный вектор или может использоваться лишь часть, в примерах полипептид из восьми аминокислот (LM2, имеющий аминокислотную последовательность EVETPIRN, SEQ ID NO:5, или его вариант M2eA, имеющий аминокислотную последовательность EVETPTRN, SEQ ID NO:6) был включен в вакцинный вектор и, как показано, вызывал гуморальный иммунный ответ после введения цыплятам. Соответственно, когда часть полипептида M2e, включенная в вакцинный вектор, является иммуногенной, иммуногенным фрагментом является пептид или полипептид, способный к вызову клеточных или гуморальных иммунных ответов. Соответственно

иммуногенным фрагментом M2e может быть полноразмерный полипептид M2e или соответственно он может представлять собой 20 или более аминокислот, 15 или более аминокислот, 10 или более аминокислот или 8 или более аминокислот полной последовательности.

Другие эпитопы, подходящие для включения в вакцинный вектор против вируса гриппа А, включают, но без ограничения, полипептиды гемагглютинина (HA) или ядерного белка (NP) вируса гриппа А. Например, пептиды SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9 или SEQ ID NO:10 могут быть включены в вакцинный вектор. В примерах SEQ ID NO:7 (HAUA) и SEQ ID NO:8 (HALB) были включены в вакцинный вектор и, как показано, вызвали гуморальный иммунный ответ после введения цыплятам (см. фиг. 2, 3 и 5, 6. Кроме того, эпитопы NP - SEQ ID NO:9 (NP54) и SEQ ID NO:10 (NP147) были включены в вакцинный вектор в примерах. Квалифицированному в данной области специалисту будет понятно, что любая из этих последовательностей может использоваться в комбинации с любым другим эпитопом, в том числе с эпитопами, происходящими из других патогенов или антигенов.

Белок HMGB1 (амфотерин, белок B1 из группы белков с высокой подвижностью) был сначала идентифицирован как ДНК-связывающий белок, важный для структуры и стабильности ДНК. Он является повсеместно экспрессируемым ядерным белком, который связывается с ДНК без специфичности в отношении ее последовательности. Этот белок является высококонсервативным и обнаруживается в растениях вплоть до млекопитающих. Аминокислотные последовательности HMGB1 данио, цыпленка и человека представлены в SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:18 и SEQ ID NO:29 соответственно. Последовательность для всех млекопитающих является высококонсервативной, при этом идентичность последовательностей составляет 98%, и аминокислотные замены являются консервативными. Поэтому белок HMGB1 одного вида может, вероятно, функционально замещать белок другого вида. Полноразмерный белок HMGB1 или его часть могут использоваться в качестве полипептида HMGB1 в описываемых здесь вакцинных векторах. HMGB1 имеет два ДНК-связывающих района, называемых блоком А, представленным в SEQ ID NO:23 и 24, и блоком В, представленным в SEQ ID NO:25 и 26 (см. Andersson and Tracey, *Annu. Rev. Immunol.* 2011, 29: 139-162, который включен сюда посредством ссылки в его полном объеме).

HMGB1 является медиатором воспаления и выполняет функцию сигнала ядерного повреждения, например, от некротических клеток. HMGB1 может также активно секретироваться клетками моноцитарной/макрофагальной линии дифференцировки в ходе процесса, для которого необходимы ацетилирование белка, передвижение через ядро и секреция. Экстраклеточный HMGB1 функционирует в качестве сильного медиатора воспаления посредством передачи сигналов через рецептор для конечных продуктов усиленного гликозилирования (RAGE) и через члены семейства Toll-подобных рецепторов (TLR), в частности TLR4. Активность связывания с RAGE была идентифицирована, и для нее требуется полипептид SEQ ID NO: 27. Для связывания с TLR4 требуется цистеин в положении 106 SEQ ID NO:18, который обнаруживается в районе блока В HMGB1.

Для воспалительных активностей HMGB1 не требуется полноразмерный белок, и были идентифицированы функциональные фрагменты. Установлено, что блок В достаточен, чтобы опосредовать провоспалительные эффекты HMGB1, и поэтому SEQ ID NO:25 и 26 являются полипептидами HMGB1 или его функциональными фрагментами в контексте настоящего изобретения. Кроме того, сайт связывания с RAGE и провоспалительная цитокиновая активность были картированы в SEQ ID NO:27 и SEQ ID NO:28 соответственно. Таким образом, эти полипептиды являются функциональными фрагментами полипептидов HMGB1 в контексте настоящего изобретения.

Квалифицированные в данной области специалисты могут идентифицировать полипептиды HMGB1 и их фрагменты, способные к стимулированию провоспалительной цитокиновой активности, используя такие способы, как те, которые описаны в публикации международной заявки с № WO02/092004, которая включена сюда посредством ссылки в ее полном объеме. Соответственно, когда полипептид HMGB1 включает RAGE-связывающий домен в положениях 150-183 аминокислот SEQ ID NO:18 (SEQ ID NO:27 или его гомолог) и домен провоспалительной цитокиновой активности между аминокислотами 89-109 SEQ ID NO:18 (SEQ ID NO:28 или его гомолог). В частности, полипептиды HMGB1 и их функциональные фрагменты или гомологи включают полипептиды, идентичные или идентичные на по крайней мере 99%, по крайней мере 98%, по крайней мере 95%, по крайней мере 90%, по крайней мере 85% или по крайней мере 80% полипептидам HMGB1 с SEQ ID NO:18 или 23-30.

По крайней мере часть антигенного полипептида и по крайней мере часть полипептида HMGB1 присутствуют на поверхности вакцинного вектора. Присутствующие на поверхности вакцинного вектора полипептиды включают полипептиды, которые включены в трансмембранный белок, взаимодействуют, ковалентно или химически сшиты, с трансмембранным белком, мембранным липидом или прикрепленным к мембране углеводом. Полипептид можно включить в трансмембранный белок, связав аминокислоты, включающие полипептид, через пептидную связь с N-концом, C-концом трансмембранного белка или где-нибудь в нем (т.е. включив между двумя аминокислотами трансмембранного белка или вместо одной или более аминокислот трансмембранного белка (т.е. посредством делеции-вставки). Соответственно полипептиды можно включить в поверхностный петлевой участок трансмембранного белка. Подходящими трансмембранными белками являются cotB и lamB, но квалифицированным в данной области специалистам будет понятно, что в наличии имеется множество подходящих трансмембранных

белков.

Альтернативно, полипептиды можно ковалентно или химически связать с белками, липидами или углеводами в мембране, или капсидом в случае использования вирусного вектора, посредством способов, имеющихся в распоряжении квалифицированных в данной области техники специалистов. Например, дисульфидные связи или перекрестное сшивание биотина с авидином можно было бы использовать для представления антигенного полипептида и полипептида HMGB1 на поверхности вакцинного вектора. Соответственно, когда антигенный полипептид и полипептид HMGB1 являются частью гибридного белка. Два полипептида можно непосредственно соединить через пептидную связь, или они могут быть разделены линкером или районом третьего белка, в который их включают.

Полинуклеотиды, кодирующие антигенный полипептид или полипептид HMGB1, можно ввести в вакцинный вектор и экспрессировать с созданием антигенного полипептида и полипептида HMGB1. Полинуклеотиды можно встроить в хромосому вакцинного вектора, или они могут кодироваться на плаزمиде или другой экстрахромосомной ДНК. Соответственно полинуклеотиды, кодирующие антигенный полипептид и/или полипептид HMGB1, могут экспрессироваться независимо или они встроены в полинуклеотид вакцинного вектора, который экспрессируется. Соответственно, когда полинуклеотид вакцинного вектора кодирует полипептид, представляемый на поверхности вакцинного вектора, такой как трансмембранный белок, полинуклеотид, кодирующий антигенный полипептид и/или полипептид HMGB1, можно встроить в полинуклеотидную последовательность вакцинного вектора, чтобы сделать возможным представление антигенного полипептида и/или полипептида HMGB1 на поверхности вектора. Например, полинуклеотид, кодирующий антигенный полипептид и полипептид HMGB1, можно встроить в рамке считывания в бактериальный полинуклеотид в районе, кодирующем поверхностный петлевой участок трансмембранного белка, из условия, чтобы бактериальная полинуклеотидная последовательность оставалась в рамке считывания (см. пример 1).

Альтернативно, полинуклеотид, кодирующий антигенный полипептид и/или полипептид HMGB1, можно встроить в полинуклеотид секретлируемого полипептида, который представляется на поверхности вакцинного вектора благодаря связи с белком, липидом или углеводом на поверхности вакцинного вектора. Квалифицированным в данной области техники специалистам будет понятно, что полинуклеотид, кодирующий антигенный полипептид и/или полипептид HMGB1, можно было бы встроить в широкий ряд полинуклеотидов вакцинного вектора для обеспечения экспрессии и представления антигенного полипептида и/или полипептида HMGB1 на иммунocyтах субъекта, подвергаемого вакцинотерапии. В примерах несколько эпитопов белков вируса гриппа, включающих эпитоп M2e, эпитоп HA и эпитоп NP, были экспрессированы с плазмиды для экспрессии в вегетативных клетках в *Bacillus subtilis*. Результирующие рекомбинантные бактерии экспрессируют включенные эпитопы, что показано с помощью иммунного ответа, представленного на фиг. 1-6.

В примерах вакцинные векторы содержат антигенные полипептиды (полипептиды M2e, HA и NP) и иммуностимулирующий полипептид (либо CD154, либо HMGB1), кодируемые одним и тем полинуклеотидом и в рамке считывания друг с другом. В альтернативных вариантах осуществления иммуностимулирующий полипептид и антигенный полипептид могут кодироваться отдельными полинуклеотидами. Квалифицированным в данной области техники специалистам будет понятно, что множество способов может использоваться для достижения представленности антигенного полипептида и полипептида HMGB1 на поверхности вакцинного вектора. Такие способы известны квалифицированным в данной области техники специалистам.

Также предоставляются композиции, включающие вакцинный вектор и фармацевтически приемлемый носитель. Фармацевтически приемлемым носителем является любой носитель, подходящий для *in vivo* введения. Соответственно, когда фармацевтически приемлемый носитель является приемлемым для оральной, интраназальной доставки или доставки через слизистую оболочку, фармацевтически приемлемый носитель может включать воду, забуференные растворы, растворы глюкозы или жидкие среды для культивирования бактерий.

Дополнительные компоненты композиций могут соответственно включать наполнители, такие как стабилизаторы, консерванты, разбавители, эмульгаторы и смазки. Примеры фармацевтически приемлемых носителей или разбавителей включают стабилизаторы, такие как углеводы (например, сорбит, маннит, крахмал, сахароза, глюкоза, декстран), белки, такие как альбумин или казеин, белоксодержащие агенты, такие как бычья сыворотка или снятое молоко, и буферы (например, фосфатный буфер). Особенно в случае добавления таких стабилизаторов к композициям композиция подходит для сушки сублимацией или сушки распылением. Вакцинный вектор в композициях может быть неспособен к репликации соответственно, когда вакцинный вектор инактивируют или убивают до добавления в композицию.

Описываемые здесь композиции могут использоваться для усиления иммунного ответа, такого как продукция антител против антигенного полипептида. Композиции, содержащие полипептиды вируса гриппа, могут также использоваться для снижения заболеваемости, связанной с последующим инфицированием вирусом гриппа. Композиции могут предотвращать вызов вирусом гриппа заболевания или любой связанной заболеваемости у субъекта, которому введены композиции или вакцинные векторы, описываемые здесь. Описываемые здесь композиции и вакцинные векторы могут уменьшать тяжесть

последующего заболевания в результате уменьшения продолжительности заболевания, снижения коэффициента заболеваемости или смертности, связанной с заболеванием, или уменьшения вероятности заражения. Заболеваемость и смертность, связанная с заболеванием, после введения описываемых здесь вакцинных векторов могут снизиться на 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или даже 100% по сравнению с подобными субъектами, которым не предоставлен вакцинный вектор.

Также предоставляются способы усиления иммунных ответов у субъекта посредством введения вакцинного вектора. Вакцинный вектор может содержать полипептид HMGB1, способный к стимулированию иммунного ответа против вакцинного вектора и связанного с ним антигенного полипептида. Вакцинный вектор, включающий полипептид HMGB1, вводят субъекту в количестве, эффективном для усиления иммунного ответа у субъекта против вакцины, в частности антигенного полипептида. Соответственно, когда вакцинный вектор содержит полинуклеотид, кодирующий полипептид, включающий аминокислоты 150-183 и 89-109 полипептида HMGB1 (SEQ ID NO:18), или его гомолог, в примерах используется полипептид из 190 аминокислот HMGB1. Соответственно, когда полинуклеотид кодирует полипептид HMGB1 вида, одинакового с видом субъекта, гетерологичные комбинации полипептидов HMGB1 и субъектов (т.е. полипептид HMGB1 человека для применения в вакцине для цыплят) могут применяться в способах настоящего изобретения, поскольку HMGB1 является высококонсервативным для широкого ряда видов. Полипептид HMGB1 может использоваться для усиления иммунного ответа у субъекта, направленного на любой чужеродный антиген или антигенный полипептид, присутствующий в вакцинном векторе или на нем. Квалифицированному в данной области техники специалисту будет понятно, что полипептид HMGB1 мог бы использоваться для усиления иммунного ответа против более одного антигенного полипептида, присутствующего в вакцинном векторе. Полипептид из HMGB1 стимулирует иммунный ответ, по крайней мере, частично в результате активации дендритных клеток и макрофагов и, следовательно, стимулирования продукции цитокинов, таких как IL-1, IL-6, IFN- γ и TNF- α . В примерах полипептид HMGB1 представлен на поверхности вакцинного вектора.

Кроме того, раскрываются способы усиления иммунного ответа против вируса гриппа А и способы снижения заболеваемости, связанной с последующим инфицированием вирусом гриппа А. Вкратце, способы включают введение субъекту вакцинного вектора, включающего эпитоп белка вируса гриппа А (антигенный полипептид вируса гриппа), способный к вызову иммунного ответа, в количестве, эффективном для вызова иммунного ответа. Эпитопом белка вируса гриппа А может быть полипептид M2e, полипептид HA, или полипептид NP, или другой полипептид вируса гриппа, обсуждавшийся выше. Включение антигенных полипептидов в вакцинный вектор можно выполнить множеством способов, известных квалифицированным в данной области техники специалистам, включающих, но без ограничения, систему сайт-направленного мутагенеза, не оставляющего глубоких следов, описанную в публикации международной заявки на патент с № WO 2008/036675. Можно также создать бактерию, которая экспрессирует полипептиды вируса гриппа, в сочетании с полинуклеотидами, способными к усилению иммунного ответа, обсуждавшимися выше. В частности, полипептид CD154 или HMGB1 может экспрессироваться вакцинным вектором для усиления иммунного ответа у субъекта против полипептидов вируса гриппа. В примерах демонстрируется вызов обильной продукции IgA и IgG на вакцинацию у цыплят. Авторы настоящего изобретения предполагают, что такой сильный ответ будет предохранять от заболеваемости, связанной с последующим инфицированием или заражением источником антигенного полипептида (вирусом гриппа в примерах), или по крайней мере снижать ее.

Композиции можно вводить множеством способов, в том числе, но без ограничения, орально, интраназально или через слизистую оболочку. Например, доставку композиций или вакцинных векторов можно осуществить с использованием аэрозоля посредством распыления, посредством добавления в пищевые продукты или воду, посредством орального введения через зонд или через глазные капли. В некоторых вариантах осуществления композиции вводят посредством инъекции, например, внутривенно, парентерально, подкожно, внутривенно, внутривенно, интракраниально или внутримышечно. В случае цыплят или другой домашней птицы композиции можно вводить в яйцо.

Субъекты включают, но без ограничения, позвоночных, соответственно млекопитающих, соответственно человека, коров, кошек, собак, свиней, или птиц, соответственно домашнюю птицу, такую как цыплята. Могут также использоваться другие модели инфекционного заболевания на животных. Усиление иммунного ответа включает, но без ограничения, вызов терапевтического или профилактического эффекта, опосредуемого иммунной системой субъекта. В частности, усиление иммунного ответа может включать увеличенную продукцию антител, например, продемонстрированную на фиг. 1-3, увеличенное переключение класса - переключение синтеза тяжелых цепей антител, например, продукцию IgA, продемонстрированную на фиг. 8, созревание антигенпрезентирующих клеток, стимуляцию Т-клеток-хелперов, стимуляцию цитолитических Т-клеток или индукцию Т- и В-клеточной иммунологической памяти.

Дозы, применимые для ведения, будут варьировать в зависимости от возраста, веса и вида субъекта, способа и пути введения и типа патогена или заболевания, против которого требуется иммунный ответ. Композицию можно вводить в любой дозе вакцинного вектора, достаточной для вызова иммунного ответа. Предполагается, что подходящими являются дозы в диапазоне от 10^3 до 10^{10} копий вектора (т.е.

бляшкообразующих или колониеобразующих единиц), от 10^4 до 10^9 копий вектора или от 10^5 до 10^7 копий вектора.

Композицию можно вводить только один раз или ее можно вводить два или более раз для увеличения иммунного ответа. Например, композицию можно вводить два или более раз с интервалами, составляющими одну неделю, две недели или три недели, один месяц, два месяца, три месяца, шесть месяцев или более. Бактерии могут быть жизнеспособными перед введением, но в некоторых вариантах осуществления бактерии могут быть убитыми или инактивированными перед введением. В некоторых вариантах осуществления бактерии могут быть способными к репликации в организме субъекта, в то время как в других вариантах осуществления бактерии могут быть неспособными к репликации в организме субъекта. Как продемонстрировано в примерах, бактериальные вакцинные векторы можно инактивировать до введения, используя формалин, этанол, нагревание или антибиотики. Квалифицированному в данной области техники специалисту будет понятно, что другие способы инактивации вакцинных векторов могли бы также использоваться.

Здесь также предоставляется вакцинный вектор *Bacillus* spp. *Bacillus* вакцинный вектор включает первую полинуклеотидную последовательность, кодирующую антигенный полипептид, и вторую полинуклеотидную последовательность, кодирующую иммуностимулирующий полипептид. Антигенный полипептид и иммуностимулирующий полипептид присутствуют на поверхности *Bacillus* вакцинного вектора, описанного выше. Антигенным полипептидом является полипептид вируса гриппа, описанный выше, а иммуностимулирующим полипептидом является полипептид HMGB1, описанный выше, или полипептид CD154.

Полинуклеотиды, кодирующие иммуностимулирующие полипептиды, которые гомологичны белкам субъекта и способны к стимулированию ответа иммунной системы на антигенный полипептид, могут быть также введены в вакцинный вектор. Как описано подробнее в примерах, вакцинный вектор может включать полипептид CD154, который способен к связыванию CD40 у субъекта и стимулированию ответа субъекта на вакцинный вектор и связанный с ним антигенный полипептид, подобно HMGB1, описанному выше. *Bacillus* вакцинный вектор может включать полипептид HMGB1, полипептид CD154 или их комбинацию. Как описано выше, полинуклеотиды, кодирующие эти полипептиды, могут быть встроены в хромосому вакцинного вектора или сохраняться вне хромосомы. Квалифицированному в данной области техники специалисту будет понятно, что эти полипептиды могут быть включены в ряд полипептидов вакцинного вектора и представлены в различных частях вакцинного вектора или могут секретироваться.

Полинуклеотид, кодирующий иммуностимулирующий полипептид, способный к усилению иммунного ответа против антигенного полипептида, может также кодировать антигенный полипептид. Полинуклеотид, кодирующий иммуностимулирующий полипептид, может быть связан с полинуклеотидом, кодирующим антигенный полипептид, например, в вакцинном векторе иммуностимулирующий полипептид и антигенный полипептид кодируются одним и тем же полинуклеотидом. В примерах полинуклеотид, кодирующий полипептид CD154, который способен к связыванию CD40, или HMGB1, также кодирует эпитоп M2e, эпитоп HA и эпитоп NP вируса гриппа А (см. SEQ ID NO:19-22). В примерах как полинуклеотид, кодирующий эпитопы белков вируса гриппа, так и полинуклеотид, кодирующий иммуностимулирующий полипептид, экспрессируются с плазмиды для экспрессии в вегетативных клетках. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотиды встроены в ген *cotB* или другой ген, кодирующий белок, представляемый на поверхности спор. Квалифицированным в данной области техники специалистом будет понятно, что бактериальные полинуклеотиды, кодирующие другие трансмембранные белки, могут также использоваться.

Как обсуждалось выше, полинуклеотид, кодирующий иммуностимулирующий полипептид, гомологичный белку у субъекта, который способен к усилению иммунного ответа против эпитопа, может быть включен в вакцинный вектор. В примерах *Bacillus* вакцинный вектор, включающий полинуклеотид, кодирующий либо полипептид CD154, способный к связыванию с CD40, либо полипептид HMGB1, как показано, усиливал иммунный ответ против эпитопа M2e и два отличных эпитопа HA, что определено по увеличению продукции антител в ответ на вакцинацию.

Соответственно, когда длина полипептида CD154 составляет менее 50 аминокислот, еще более соответственно менее 40, менее 30 или менее 20 аминокислот, длина полипептида может составлять от 10 до 15 аминокислот, от 10 до 20 аминокислот или от 10 до 25 аминокислот. Среди различных видов последовательность CD154 и CD40-связывающий район не являются в высокой степени консервативными. Последовательности CD154 курицы и человека представлены в SEQ ID NO:11 и SEQ ID NO:12 соответственно.

CD40-связывающие районы CD154 были определены для ряда видов, в том числе человека, курицы, утки, мыши и крупного рогатого скота, и представлены в SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17 соответственно. Хотя существуют вариативность последовательностей в CD40-связывающем районе между видами, в представленных ниже примерах показано, что полипептид CD154 человека способен к усилению иммунного ответа у цыплят. Следовательно, настоящее изобретение можно осуществить на практике, используя видоспецифичные полипептиды CD154 или гетероло-

гичный полипептид CD154. В частности, полипептиды CD154 и их функциональные фрагменты или гомологи включают полипептиды, идентичные или идентичные на по крайней мере 99%, по крайней мере 98%, по крайней мере 95%, по крайней мере 90%, по крайней мере 85% или по крайней мере 80% полипептидам CD154 с SEQ ID NO:11-17.

Bacillus вакцинный вектор, описываемый здесь, может использоваться в способах усиления иммунного ответа и способах снижения заболеваемости гриппом у субъекта, описанных выше. *Bacillus* вакцинный вектор может использоваться для изготовления композиций для введения субъектам, таким как те, которые также описаны выше.

Гетерологичные полинуклеотиды, кодирующие антигенные полипептиды, могут быть встроены в бактериальный геном в любом несущественном месте, или альтернативно, их можно переместить на плазмиду, используя хорошо известные в данной области техники способы. Одно место, подходящее для встраивания полинуклеотидов, находится внутри поверхностных частей трансмембранных белков или связано с последовательностями, которые ориентируют гетерологичный полинуклеотид на пути секреции. Примерами гена трансмембранного белка, подходящего для вставки полинуклеотидов, являются ген *cotB* *Bacillus* и ген *lamb* *Salmonella*.

Гетерологичные полинуклеотиды включают, но без ограничения, полинуклеотиды, кодирующие антигены, отбираемые из патогенных микроорганизмов или вирусов, отличных от вакцинного вектора. Такие полинуклеотиды могут происходить от патогенных вирусов, таких как вирус гриппа (например, M2e, гемагглютинин или нейраминидаза), вирусы герпеса (например, гены, кодирующие структурные белки вирусов герпеса), ретровирусы (например, оболочечный белок *gpl60*), аденовирусы, парамиксовирусы, коронавирусы и т.п. Можно также получить гетерологичные полинуклеотиды из патогенных бактерий, например гены, кодирующие бактериальные белки, такие как токсины или белки наружной мембраны. Кроме того, гетерологичные полинуклеотиды из паразитов, таких как *Eimeria*, являются привлекательными кандидатами на применение в векторной вакцине.

Дополнительные иммуностимулирующие полипептиды, вовлеченные в приведение в действие иммунной системы, могут быть также включены в вакцинные векторы, описываемые здесь.

Полинуклеотиды могут кодировать молекулы иммунной системы, известные в отношении их стимулирующих эффектов, такие как интерлейкин, фактор некроза опухолей или интерферон, или другой полипептид, вовлеченных в иммунорегуляцию.

Следующие примеры, как подразумевается, являются исключительно иллюстративными и не подразумеваются как ограничения объема настоящего изобретения или прилагаемой формулы изобретения.

Примеры

Пример 1. Конструирование HA/NP/M2e/cCD154 и HA/NP/M2e/HMGB1 *Bacillus* векторов.

Штаммы и условия культивирования.

Все плазмиды сначала сохраняли в клетках *E. coli* TOP10 (Invitrogen, Carlsbad, CA, США), кроме особо оговоренных случаев. *Bacillus* spp. использовали для введения мутаций (штамм *Bacillus subtilis*, Poultry Health Laboratory, названный NP122). Бактерии, содержащие плазмиду pDGIEF и pHT10, наращивали при 37°C.

Среду Лурия-Бертани (LB) использовали для обычного наращивания клеток, а среду SOC (Invitrogen, Carlsbad, CA, США) использовали для фенотипического выражения после электропорации. По мере уместности в среду добавляли следующее: изопропил-β-D-тиогаалактопиранозид (IPTG) в концентрации 1 мМ, ампициллин (Amp) в концентрации 100 мкг/мл, спектиномицин (SP) в концентрации 100 мкг/мл и хлорамфеникол (Cm) в концентрации 5 мкг/мл.

Плазмиды.

Плазмиды pDGIEF (*Bacillus* Genetic Stock Center, Columbus, OH) и pHT10, использованные в настоящем исследовании, были описаны ранее (Zhang et al., *Nuc. Acids Research* 2006, 34 (9): 1-8 и Nguyen et al., *Curr. Micro.* 2007, 55: 89-93). Плазида pDGIEF выполняла функцию матрицы для амплификации гена *mazF*, который использовался в качестве промежуточного селективируемого маркера во время манипулирования хромосомой *Bacillus*. Плазмиду pHT10 использовали для кодирования и продуцирования гетерологичных последовательностей эпитопов белков вируса птичьего гриппа в *Bacillus* spp. Эта плазида содержит ген устойчивости к Cm, ее индукцию осуществляют, добавляя 1 мМ IPTG, и ее сохраняют в *Bacillus* при 37°C.

Продукция гетерологичных белков для экспрессии в вегетативных клетках:

Плазмиду pHT10, купленную у MoBioTec/Voca Scientific, Voca Raton, FL (Nguyen et al., 2007), преобразовывали в сайт множественного клонирования при добавлении вставочной последовательности с оптимизацией частоты использования кодонов для *Bacillus subtilis*. Проводили секвенирование ДНК для подтверждения правильной вставки последовательности. По-новому модифицированную плазмиду затем трансформировали в *Bacillus*. Вкратце, культуры *Bacillus* наращивали в течение ночи при 37°C в среде HS (среде Спицайзена, дополненной 0,5% глюкозы, 50 мкг/мл DL-триптофана, 50 мкг/мл урацила, 0,02% гидролизата казеина, 0,1% дрожжевого экстракта, 8 мкг/мл аргинина, 0,1 мкг/мл гистидина, 1 мМ MgSO₄). Ночную культуру (1 мл) использовали для засева в 20 мл среды (среды Спицайзена, дополненной 0,5% глюкозы, 5 мкг/мл DL-триптофана, 5 мкг/мл урацила, 0,01% гидролизата казеина, 0,1% дрож-

жевого экстракта, 1 mM MgSO₄, 2,5 mM MgCl₂, 0,5 mM CaCl₂), и инкубацию проводили при встряхивании в течение 3-4 ч 30°C. К 1 мл результирующей культуры LS добавляли 10 мкл 0,1M EGTA, и инкубацию проводили при комнатной температуре в течение 5 мин. Затем добавляли 1-2 мкг плазмидной ДНК, осуществляли встряхивание в течение 2 ч при 37°C, и осуществляли засев на чашки с LB с селективными антибиотиками. Эти трансформированные *Bacillus* spp теперь продуцируют гетерологичные последовательности эпитопов из AI после индукции 1 mM IPTG.

ПЦР.

Все праймеры, использованные для ПЦР, перечислены в табл. 1. Типичные условия для ПЦР состояли из приблизительно 0,1 мкг очищенной геномной, плазмидной или образованной в ходе ПЦР ДНК (Qiagen, Valencia, CA, США), 1× буфера для полимеразы Pfu, 5 Е полимеразы Pfu (Stratagene La Jolla, CA, США), 1 mM dNTP (GE Healthcare Bio-Sciences Corp., Piscataway, NJ), 1,2 мМ каждого праймера в общем объеме, равном 50 мкл. Термоциклер - прибор для амплификации ДНК (Bio-Rad, Hercules, CA, США) применяли со следующими условиями амплификации: 94°C в течение 2 мин; 30 циклов, каждый из которых состоял из 94°C в течение 30 с, 58°C в течение 60 с, 72°C в течение 90 с для каждой 1 т.о.; и 72°C в течение 10 мин для коежного удлинения. Каждый продукт ПЦР подвергали очистке из геля (Qiagen, Valencia, CA, США) и элюированию либо в 25 мкл буфера EB для приготвления матрицы, используемых в ПЦР с использованием перекрывания и удлинения, либо в 50 мкл буфера EB, осаждали этанолом и суспендировали в 5 мкл ddH₂O для электропорации в *Bacillus* spp.

Таблица 1

Последовательности праймеров,
использованные для создания вакцинного вектора

Праймер	Амплифицируемый район	Последовательность праймера (SEQ ID NO.)
mazF прямой	MazF ген	5' ct_aaaactcttcagatgatcaaacatcctcactgcgacgctttccagtcgggaaa3' (SEQ ID NO: 31)
mazF обратный	MazF ген	5' ggaacgtagacgaacgaccagatcccctatccaagggttat3' (SEQ ID NO: 32)
5' CotB прямой	5' Cot B	5' gaaatgctcagatgctgatga 3' (SEQ ID NO: 33)
5' CotB обратный	5' Cot B	5' ggatgattgatcctcagaattttag3' (SEQ ID NO: 34)
3' CotB прямой	3' Cot B	5' aaactgctcgcctgcacgtica3' (SEQ ID NO: 35)
3' CotB обратный	3' Cot B	5' ttcgcttccagtgatgatctcg3' (SEQ ID NO: 36)
BS/AI/HMGB1 прямой	BS/AI/HMGB1 5' CotB	5' aaccattctcaattgaatttgaatctgaacagctgctgatgagcacgcttcataatcattaaatc gcccgatgacagacgatcttccggattgctgtagatgaatcctaccctgcttaaccagctcctgct ttgatatt ggaattgatactcagaatttag3' (SEQ ID NO: 37)
BS/AI/HMGB1 обратный	BS/AI/HMGB1 3' CotB	5' ttaacaatgaaagatggctcgtcctatccatccatcgcctcgaatattcatttgaataaactcatt cctcagaattgaaacacagattagaattcaatcattgatgacaaatcattatgacacacacatcataca tcagaattgaaacacagattagaatcaatcctgctgctcagctca3' (SEQ ID NO: 38)
BS/AI/CD154 прямой	BS/AI/CD154 5' CotB	5' ttaacaatgattaaatctgacagcgatgatgtagacagaaccatttcaattgtaattgaattgaa cattcgtctgatgagcagcttctcattcaatcaatcaatcggcggatgacacagatcattgccggattg cgatgatgatcctcagaatttag3' (SEQ ID NO: 39)
BS/AI/CD154 обратный	BS/AI/CD154 3' CotB	5' caagaaatcaatcatttgaataaactcaatcattcagaatggaacacgattagaactcaatcattgaa gaaatattgaaagatattgcaacatagacaaaggcaattggtgctgcaaggaacaaattgttgcaaa agcagaataatcaaaaactcaggctgctcagctca3' (SEQ ID NO: 40)

В табл.1 выделенные курсивом нуклеотиды являются нуклеотидами, которые комплементарны той или другой стороне сайта вставки в ген CotB *Bacillus subtilis*.

Электропорация.

Вкратце, клетки засевали в 10 мл среды LB и наращивали при 37°C в течение ночи. Затем 100 мкл ночной культуры вновь засевали в 10 мл новой среды LB с инкубацией при 37°C в течение 3-4 ч. Клетки промывали пять раз водой ddH₂O и ресуспендировали в 60 мкл 10% глицерина. Затем на клетки посылали импульсы при 2,4-2,45 кВ в течение 1-6 мс, их инкубировали в 0,5 мл SOC в течение 2-3 ч при 37°C и засевали на среду LB с соответствующими антибиотиками.

Интеграция в хромосому гетерологичной ДНК для представления в оболочке споры.

Рекомбинантные штаммы *Bacillus*, содержащие устойчиво интегрированные копии отобранных эпитопов M2e, HA и NP, конструировали, используя недавно опубликованные способы с модификацией. Вкратце, штаммы *Bacillus* трансформировали кассетой MazF (Zhang et al., 2006), которая порождает штамм, который был чувствительным к IPTG и устойчивым к спектомицину. Кассету MazF, фланкированную гомологичной ДНК размером приблизительно 300 п.о. с каждой стороны, вводили в ген CotB (Isticato et al., 2001) *Bacillus* вектора с помощью электропорации с последующим выращиванием в среде, содержащей спектомицин, для отбора положительных клонов, которые теперь содержат кассету MazF, которая является устойчивой к спектомицину.

После подтверждения мутации MazF в CotB этот район замещали оптимизированной в отношении частоты использования кодонов последовательностью ДНК, кодирующей антигенные детерминанты AI, снова фланкированной гомологичной ДНК размером приблизительно 300 п.о. Это выполняли посредством создания продукта ПЦП, используя ПЦР с использованием перекрывания и удлинения, чтобы создать антигенные последовательности, фланкированные последовательностями размером приблизительно 300 п.о. с каждой стороны, гомологичными хромосоме *Bacillus* (Cox et al., 2007). Продукт ПЦР вводили в *Bacillus* снова посредством электропорации и замещения кассеты MazF. Отбор трансформантов осуществляли на чашках, содержащих IPTG, положительные клоны должны теперь быть нереагирующими на IPTG и чувствительными к спектомицину. Правильную вставку последовательности в хромосому подтверждали посредством секвенирования ДНК.

Пример 2. Исследование 1 и 2 вакцинации.

Цыплят в день вылупления (день 0) получали с местной коммерческой инкубаторной станции и случайным образом разделяли на группы терапии (n=15/группу терапии в эксперименте 1 и n=20/группу терапии в эксперименте 2). Всех цыплят в каждой группе терапии снабжали ярлычками и занумеровывали. Цыплят орально инфицировали посредством введения через зонд 0,25 мл солевого раствора или 10^6 - 10^8 КОЕ/мл различных *Bacillus* терапий, указанных в табл.2 для исследования 1 и в табл.3 для исследования 2.

Таблица 2
Заражающая доза для каждой группы терапии
в исследовании 1 вакцинации

Группа терапии	Заражающая доза
Только солевой раствор	
BS/AI/HMGB1	10^6 КОЕ/мл
BS/AI/HMGB1	10^8 КОЕ/мл
BS/AI/CD154	10^6 КОЕ/мл
BS/AI/CD154	10^8 КОЕ/мл

Таблица 3
Заражающая доза для каждой группы терапии
в исследовании 2 вакцинации

Группа терапии	Заражающая доза
BSBB (<i>Bacillus</i>)	10^6 КОЕ/мл
BS/AI/HMGB1	10^6 КОЕ/мл
BS/AI/CD154	10^6 КОЕ/мл
BS/AI/HMGB1 инактивированные нагреванием	10^6 КОЕ/мл
BS/AI/HMGB1 инактивированные формалином	10^6 КОЕ/мл
BS/AI/HMGB1 подвергнутые основанной на антибиотиках инактивации	10^6 КОЕ/мл
BS/AI/HMGB1 инактивированные этанолом	10^6 КОЕ/мл

В исследовании 2 бактерии инактивировали несколькими различными способами для оценки, необходима ли репликация для вызова продукции антител, направленных против антигенных пептидов вируса гриппа. Использовали несколько способов инактивации, поскольку способы инактивации могли привести к разрушению эпитопа и привести к неверной интерпретации данных и подтверждению необходимости репликации или жизнеспособности *Bacillus* вектора. Бактерии инактивировали посредством инкубации в течение 10 мин в 0,022% формалине (инактивированные формалином); инкубации в течение 10 мин при 70°C (инактивированные нагреванием); инкубации в 5 мкг/мл гентамицина (подвергнутые основанной на антибиотиках инактивации) или инкубации в течение 10 мин в 70% этаноле (инактивированные этанолом).

Каждую группу терапии размещали в отдельном напольном загоне на свежей сосновой подстилке и неограниченно предоставляли воду и пищу. В дни 11 и 21 после вылупления птицы получали бустер-вакцину той же терапии, которую они получали в день 0. Также в дни 21 и 31/32 от каждой снабженной ярлычком птицы получали кровь, и снимали сыворотку.

Сыворотку, полученную от снабженных ярлычками птиц в каждой группе терапии, затем использовали в ELISA с захватом антител для определения продукции антител, специфичных для M2e, HAUA и HALB. Вкратце, индивидуальные лунки 96-луночного планшета покрывали 10 мкг/мл эпитопа M2e, эпитопа HAUA или эпитопа HALB, конъюгированного с BSA. Допускали прохождение адгезии антигенов в течение ночи при 4°C. Планшеты промывали PBS+0,05% Tween 20, блокировали PBS Superblock (Pierce Chemical Co.) в течение как минимум 2 ч и инкубировали в течение 2 ч с сывороткой, предварительно полученной от птиц в каждой из групп терапий, описанных выше. Планшеты промывали PBS+0,05% Tween 20 с последующей инкубацией с конъюгированным с пероксидазой козым вторым антителом против IgY кур (в разведении 1:7500), полученным из Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA), в течение еще часа. После последующей промывки планшеты проявляли, используя набор с субстратом для пероксидазы, полученный от Fisher Scientific, и оптические плотности считывали на спектрофотометре при 450 и 405 нм.

Образцы объединенных сывороток от групп, получающих векторные вакцины, использовали в качестве положительных контролей, а образцы объединенных сывороток от невакцинированных групп использовали в качестве отрицательных контролей в каждом планшете для замены сыворотки от групп терапий. Оптические плотности, полученные для положительного контроля, отрицательного контроля и экспериментальных образцов, использовали для расчета отношений образца к положительному контролю (отношений S/P), используя следующий расчет:

$$\text{Расчет отношения S/P: } \frac{\text{среднее значение для образца - среднее значение для отрицательного контроля}}{\text{среднее значение для положительного контроля - среднее значение для отрицательного контроля}}$$

Расчитанные отношения S/P для каждого исследования представлены на фиг. 1-6. На фиг. 1-3 представлены суммарные титры антител против M2e, HALB и HAUA для исследования 1, соответственно в дни 21 и 31 после вылупления. Результаты доказывают, что сильные иммунные ответы против каждого из этих антигенов были вызваны после орального введения Bacillus, экспрессирующей каждый из этих эпитопов вместе либо с CD154, либо HMGB1 в качестве иммуностимулирующего пептида. На фиг. 4-6 представлены суммарные титры антител против M2e, HALB и HAUA для исследования 2, соответственно в дни 21 и 32 после вылупления. Результаты доказывают, что сильные иммунные ответы против каждого из этих эпитопов были вызваны после орального введения живой Bacillus, экспрессирующей эпитоп и иммуностимулирующий пептид. На фиг. 4-6 также показано, что сходные уровни специфических антител были также порождены, когда вектор (Bacillus) был инактивирован до введения.

Пример 3. Исследование 3 вакцинации.

Цыплят в день вылупления (день 0) получали с местной коммерческой инкубаторной станции и случайным образом разделяли на группы терапии (n=20/группу терапии). Всех цыплят в каждой группе терапии снабжали ярлычками и занумеровывали. Цыплят орально инфицировали посредством введения через зонд 0,25 мл солевого раствора или 10^5 - 10^8 КОЕ/мл Bacillus вектора (BSBB), Bacillus вектора, экспрессирующего эпитопы белков птичьего гриппа и HMGB1 (BS/AI/HMGB1), или различных количеств BS/AI/HMGB1 вектора после инактивации формалином (как описано выше). В день 10 после вылупления птицы получали бустер-вакцину той же терапии, которую они получали в день 0. Также в дни 21 и 32 от каждой снабженной ярлычком птицы получали кровь, и снимали сыворотку. Уровни специфических для M2e антител класса IgG в сыворотке определяли, используя описанный выше способ с использованием меченого пероксидазой второго антитела, специфичного для IgG кур (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA). Представленные на фиг. 7 результаты доказывают, что так же как живые бактерии инактивированные формалином бактерии были способны к стимулированию продукции специфических для M2e антител класса IgG. Этот результат был неожиданным, поскольку обычно полагают, что только живые бактерии могут стимулировать сильный иммунный ответ после орального введения.

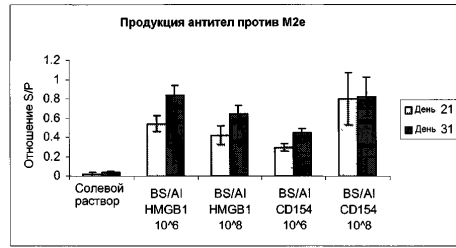
Пример 4. Исследование 4 вакцинации.

Цыплят в день вылупления (день 0) получали с местной коммерческой инкубаторной станции и случайным образом разделяли на группы терапии (n=20-35/группу терапии). Всех цыплят в каждой группе терапии снабжали ярлычками и занумеровывали. Цыплят инфицировали посредством орального введения через зонд или подкожной инъекции 0,25 мл солевого раствора или 10^6 КОЕ/мл Bacillus вектора (BSBB), Bacillus вектора, экспрессирующего эпитопы белков птичьего гриппа и HMGB1 (BSAI), или BSAI вектора после инактивации формалином (как описано выше) или после инактивации формалином с последующей лиофилизацией (воссоздаваемого с использованием солевого раствора непосредственно перед введением). В день 10 после вылупления некоторые птицы получали бустер-вакцину той же терапии, которую они получали в день 0. В дни 11, 14 и 21 от каждой снабженной ярлычком птицы получали кровь, и снимали сыворотку. Уровни специфических для M2e антител классов IgA и IgG в сыворотке определяли, используя описанный выше способ с использованием меченого пероксидазой антитела против IgA кур (GenTex) или меченого пероксидазой второго антитела против IgG кур (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA). Представленные на фиг. 8 результаты доказывают, что приблизительно так же как живые бактерий инактивированные формалином бактерии были способны к стимулированию продукции специфических для M2e антител класса IgA после орального введения. Напротив, в случае подкожного введения инактивированный BSAI вектор не был настолько же эффективен в стимулировании продукции антител класса IgA, и лиофилизированные бактерии не стимулировали продукцию IgA. Представленные на фиг. 9 результаты доказывают, что каждый из протоколов введения BSAI поддерживал обильное образование IgG.

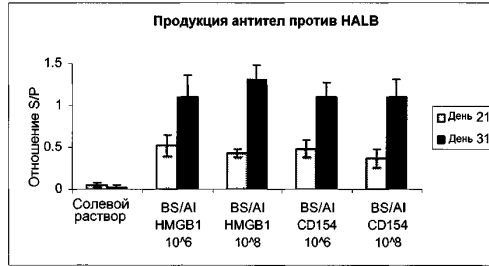
ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Вакцинный вектор, включающий антигенный полипептид и полипептид HMGB1, в котором по крайней мере часть антигенного полипептида и по крайней мере часть полипептида HMGB1 присутствуют на поверхности вакцинного вектора.
2. Вакцинный вектор по п.1, в котором антигенным полипептидом является специфичный для вируса гриппа полипептид.
3. Вакцинный вектор по п.2, в котором антигенным полипептидом является полипептид M2e, HA или NP вируса гриппа.
4. Вакцинный вектор по п.3, в котором антигенный полипептид выбирают из группы, состоящей из SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9 и SEQ ID NO:10.

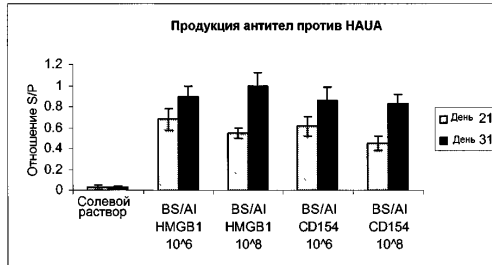
5. Вакцинный вектор по любому из пп.1-4, в котором полипептид HMGB1 выбирают из SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30.
6. Вакцинный вектор по любому из пп.1-5, который является бактерией.
7. Вакцинный вектор по п.6, в случае которого бактерией является *Bacillus spp.*
8. Вакцинный вектор по любому из пп.1-7, в котором антигенный полипептид и/или полипептид HMGB1 включен в трансмембранный белок.
9. Вакцинный вектор по п.8, в котором антигенный полипептид и/или полипептид HMGB1 находятся в поверхностном петлевом участке трансмембранного белка.
10. Вакцинный вектор по п.8 или 9, в случае которого трансмембранным белком является *cotB*.
11. Вакцинный вектор по любому из пп.1-10, в котором антигенный полипептид и полипептид HMGB1 формируют часть гибридного белка.
12. Композиция, включающая вакцинный вектор по любому из пп.1-11 и фармацевтически приемлемый носитель.
13. Композиция по п.12, в которой фармацевтически приемлемый носитель является приемлемым для орального или интраназального введения.
14. Композиция по п.12 или 13, в которой вакцинный вектор не способен к репликации, является инактивированным или убитым.
15. Способ усиления иммунного ответа у субъекта, включающий введение субъекту вакцинного вектора по любому из пп.1-11 или композиции по любому из пп.12-14 в количестве, эффективном для усиления иммунного ответа у субъекта против антигенного полипептида.
16. Способ по п.15, в котором вакцинный вектор вводят орально или интраназально.
17. Способ по п.16, в котором иммунным ответом является продукция антител класса IgA против антигенного полипептида.
18. Способ по любому из пп.15-17, в котором вакцинный вектор не способен к репликации в организме субъекта или является инактивированным или убитым перед введением субъекту.
19. Вакцинный вектор *Bacillus spp.*, включающий первую полинуклеотидную последовательность, кодирующую антигенный полипептид, присутствующий на поверхности вакцинного вектора, и вторую полинуклеотидную последовательность, кодирующую иммуностимулирующий полипептид, в котором антигенный полипептид и иммуностимулирующий полипептид присутствуют на поверхности вакцинного вектора, причем антигенным полипептидом является полипептид вируса гриппа, а иммуностимулирующим полипептидом является полипептид HMGB1.
20. Вакцинный вектор по п.19, в котором первый полинуклеотид и второй полинуклеотид встроены в третью полинуклеотидную последовательность, кодирующую поверхностную часть трансмембранного белка.
21. Вакцинный вектор по п.20, в случае которого трансмембранным белком является *cotB*.
22. Вакцинный вектор по любому из пп.19-21, в котором антигенным полипептидом является полипептид M2e вируса гриппа, полипептид HA вируса гриппа или полипептид NP вируса гриппа.
23. Вакцинный вектор по п.22, в котором антигенный полипептид выбирают из группы, состоящей из SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9 и SEQ ID NO:10.
24. Вакцинный вектор по любому из пп.19-23, в котором полипептид HMGB1 выбирают из SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30.
25. Способ усиления иммунного ответа у субъекта, включающий введение субъекту вакцинного вектора *Bacillus spp.* по любому из пп.19-24 в количестве, эффективном для усиления иммунного ответа у субъекта против антигенного полипептида.
26. Способ по п.25, в котором вакцинный вектор вводят орально или интраназально.
27. Способ по п.26, в котором иммунным ответом является продукция антител класса IgA против антигенного полипептида.
28. Способ по любому из пп.25-27, в котором вакцинный вектор не способен к репликации в организме субъекта или является инактивированным или убитым перед введением субъекту.
29. Способы снижения связанной с вирусом гриппа А заболеваемости у субъекта, включающий введение субъекту вакцинного вектора по любому из пп.2-11 или 19-24 или композиции по любому из пп.12-14 в количестве, эффективном для снижения связанной с вирусом гриппа А заболеваемости у субъекта.



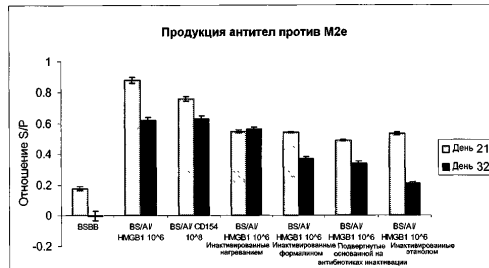
Фиг. 1



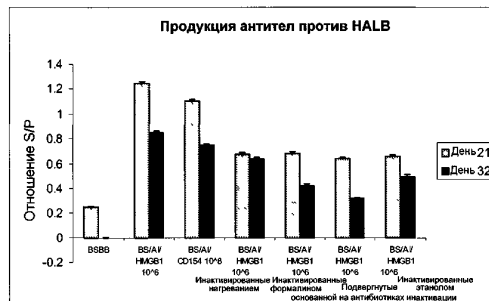
Фиг. 2



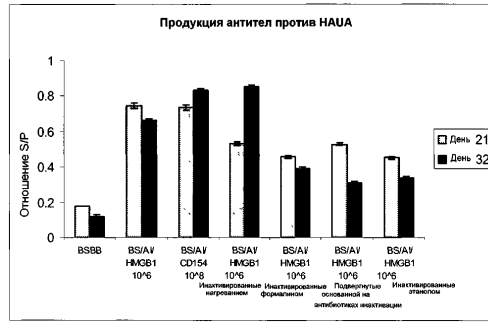
Фиг. 3



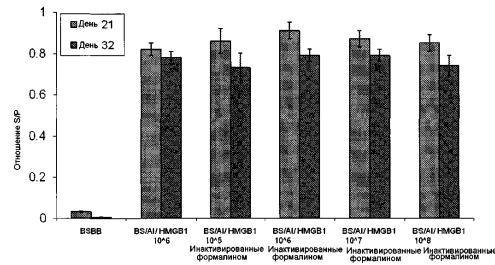
Фиг. 4



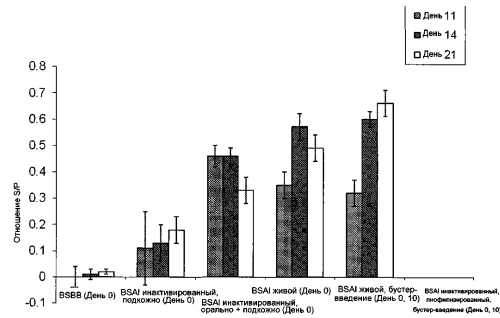
Фиг. 5



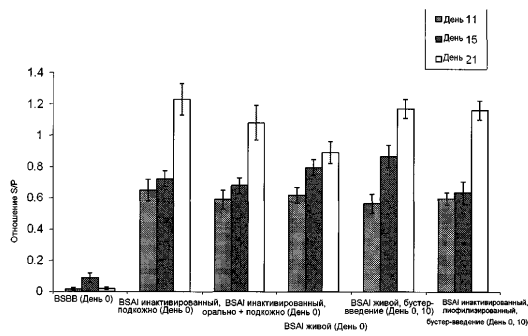
Фиг. 6



Фиг. 7



Фиг. 8



Фиг. 9

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> UNIVERSITY OF ARKANSAS
THE TEXAS A&M UNIVERSITY SYSTEM

<120> ВАКЦИННЫЕ ВЕКТОРЫ И СПОСОБЫ УСИЛЕНИЯ ИММУННЫХ ОТВЕТОВ

<130> 5658-00099

<150> US 61/297,098
<151> 2010-01-21

<160> 40

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 24
<212> БЕЛОК
<213> Вирус птичьего гриппа

<220>
<221> misc_feature
<223> M2e

<400> 1

Met Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Thr Arg Asn Gly Trp Glu
1 5 10 15

Cys Lys Cys Ser Asp Ser Ser Asp
20

<210> 2
<211> 24
<212> БЕЛОК
<213> Вирус птичьего гриппа

<220>
<221> misc_feature
<223> M2e

<400> 2

Met Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Thr Arg Asn Gly Trp Gly
1 5 10 15

Cys Arg Cys Ser Asp Ser Ser Asp
20

<210> 3
<211> 24
<212> БЕЛОК
<213> Вирус птичьего гриппа

<220>
<221> misc_feature
<223> M2e

<400> 3

Met Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Gly Trp Gly
1 5 10 15

Cys Arg Cys Asn Asp Ser Ser Asp
20

<210> 4
<211> 24
<212> БЕЛОК
<213> Вирус птичьего гриппа

<220>
<221> misc_feature
<223> M2e

<400> 4

Met Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Thr Arg Asn Gly Trp Glu
1 5 10 15

Cys Arg Cys Asn Asp Ser Ser Asp
20

<210> 5
<211> 8
<212> БЕЛОК
<213> Вирус птичьего гриппа

<220>
<221> misc_feature
<223> M2e

<400> 5

Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn
1 5

<210> 6
<211> 8
<212> БЕЛОК
<213> Вирус птичьего гриппа

<220>
<221> misc_feature
<223> M2e

<400> 6

Glu Val Glu Thr Pro Thr Arg Asn
1 5

023058

<210> 7
 <211> 12
 <212> БЕЛОК
 <213> Вирус птичьего гриппа

<220>
 <221> misc_feature
 <223> HA5 UA
 <400> 7
 Leu Leu Ser Arg Ile Asn His Phe Glu Lys Ile Gln
 1 5 10

<210> 8
 <211> 19
 <212> БЕЛОК
 <213> Вирус птичьего гриппа

<220>
 <221> misc_feature
 <223> HA5 LB
 <400> 8
 Ala Asn Pro Ala Asn Asp Leu Cys Tyr Pro Gly Asp Phe Asn Asp Tyr
 1 5 10 15
 Glu Glu Leu

<210> 9
 <211> 16
 <212> БЕЛОК
 <213> Вирус птичьего гриппа

<220>
 <221> misc_feature
 <223> NP 54-69
 <400> 9
 Gly Arg Leu Ile Gln Asn Ser Ile Thr Ile Glu Arg Met Val Leu Ser
 1 5 10 15

<210> 10
 <211> 14
 <212> БЕЛОК
 <213> Вирус птичьего гриппа

<220>
 <221> misc_feature
 <223> NP 147-160
 <400> 10
 Thr Tyr Gln Arg Thr Arg Ala Leu Val Arg Thr Gly Met Asp
 1 5 10

<210> 11
 <211> 272
 <212> БЕЛОК
 <213> Gallus gallus

<220>
 <221> misc_feature
 <223> CD154 курицы
 <400> 11
 Met Asn Glu Ala Tyr Ser Pro Ala Ala Pro Arg Pro Met Gly Ser Thr
 1 5 10 15
 Ser Pro Ser Thr Met Lys Met Phe Met Cys Phe Leu Ser Val Phe Met
 20 25 30
 Val Val Gln Thr Ile Gly Thr Val Leu Phe Cys Leu Tyr Leu His Met
 35 40 45
 Lys Met Asp Lys Met Glu Glu Val Leu Ser Leu Asn Glu Asp Tyr Ile
 50 55 60
 Phe Leu Arg Lys Val Gln Lys Cys Gln Thr Gly Glu Asp Gln Lys Ser
 65 70 75 80
 Thr Leu Leu Asp Cys Glu Lys Val Leu Lys Gly Phe Gln Asp Leu Gln
 85 90 95
 Cys Lys Asp Arg Thr Ala Ser Glu Glu Leu Pro Lys Phe Glu Met His
 100 105 110
 Arg Gly His Glu His Pro His Leu Lys Ser Arg Asn Glu Thr Ser Val
 115 120 125
 Ala Glu Glu Lys Arg Gln Pro Ile Ala Thr His Leu Ala Gly Val Lys
 130 135 140
 Ser Asn Thr Thr Val Arg Val Leu Lys Trp Met Thr Thr Ser Tyr Ala
 145 150 155 160
 Pro Thr Ser Ser Leu Ile Ser Tyr His Glu Gly Lys Leu Lys Val Glu
 165 170 175
 Lys Ala Gly Leu Tyr Tyr Ile Tyr Ser Gln Val Ser Phe Cys Thr Lys
 180 185 190

023058

Ala Ala Ala Ser Ala Pro Phe Thr Leu Tyr Ile Tyr Leu Tyr Leu Pro
195 200 205

Met Glu Glu Asp Arg Leu Leu Met Lys Gly Leu Asp Thr His Ser Thr
210 215 220

Ser Thr Ala Leu Cys Glu Leu Gln Ser Ile Arg Glu Gly Gly Val Phe
225 230 235 240

Glu Leu Arg Gln Gly Asp Met Val Phe Val Asn Val Thr Asp Ser Thr
245 250 255

Ala Val Asn Val Asn Pro Gly Asn Thr Tyr Phe Gly Met Phe Lys Leu
260 265 270

<210> 12
<211> 261
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<223> CD154 человека

<400> 12

Met Ile Glu Thr Tyr Asn Gln Thr Ser Pro Arg Ser Ala Ala Thr Gly
1 5 10 15

Leu Pro Ile Ser Met Lys Ile Phe Met Tyr Leu Leu Thr Val Phe Leu
20 25 30

Ile Thr Gln Met Ile Gly Ser Ala Leu Phe Ala Val Tyr Leu His Arg
35 40 45

Arg Leu Asp Lys Ile Glu Asp Glu Arg Asn Leu His Glu Asp Phe Val
50 55 60

Phe Met Lys Thr Ile Gln Arg Cys Asn Thr Gly Glu Arg Ser Leu Ser
65 70 75 80

Leu Leu Asn Cys Glu Glu Ile Lys Ser Gln Phe Glu Gly Phe Val Lys
85 90 95

Asp Ile Met Leu Asn Lys Glu Glu Thr Lys Lys Glu Asn Ser Phe Glu
100 105 110

Met Gln Lys Gly Asp Gln Asn Pro Gln Ile Ala Ala His Val Ile Ser
115 120 125

Glu Ala Ser Ser Lys Thr Thr Ser Val Leu Gln Trp Ala Glu Lys Gly
130 135 140

Tyr Tyr Thr Met Ser Asn Asn Leu Val Thr Leu Glu Asn Gly Lys Gln
145 150 155 160

Leu Thr Val Lys Arg Gln Gly Leu Tyr Tyr Ile Tyr Ala Gln Val Thr
165 170 175

Phe Cys Ser Asn Arg Glu Ala Ser Ser Gln Ala Pro Phe Ile Ala Ser
180 185 190

Leu Cys Leu Lys Ser Pro Gly Arg Phe Glu Arg Ile Leu Leu Arg Ala
195 200 205

Ala Asn Thr His Ser Ser Ala Lys Pro Cys Gly Gln Gln Ser Ile His
210 215 220

Leu Gly Gly Val Phe Glu Leu Gln Pro Gly Ala Ser Val Phe Val Asn
225 230 235 240

Val Thr Asp Pro Ser Gln Val Ser His Gly Thr Gly Phe Thr Ser Phe
245 250 255

Gly Leu Leu Lys Leu
260

<210> 13
<211> 11
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<223> пептид CD154 человека

<400> 13

Trp Ala Glu Lys Gly Tyr Tyr Thr Met Ser Cys
1 5 10

<210> 14
<211> 11
<212> БЕЛОК
<213> Gallus gallus

<220>
<221> misc_feature
<223> пептид CD154 курицы

<400> 14

```

Trp Met Thr Thr Ser Tyr Ala Pro Thr Ser Ser
1          5          10

<210> 15
<211> 10
<212> БЕЛОК
<213> Anas sp.

<220>
<221> misc_feature
<223> пептид CD154 утки

<400> 15
Trp Asn Lys Thr Ser Tyr Ala Pro Met Asn
1          5          10

<210> 16
<211> 10
<212> БЕЛОК
<213> Mus sp.

<220>
<221> misc_feature
<223> пептид CD154 мыши

<400> 16
Trp Ala Lys Lys Gly Tyr Tyr Thr Met Lys
1          5          10

<210> 17
<211> 10
<212> БЕЛОК
<213> Bos taurus

<220>
<221> misc_feature
<223> пептид CD154 коровы

<400> 17
Trp Ala Pro Lys Gly Tyr Tyr Thr Leu Ser
1          5          10

<210> 18
<211> 190
<212> БЕЛОК
<213> Gallus gallus

<220>
<221> misc_feature
<223> аминокислотная HMGB1 курицы

<400> 18
Met Gly Lys Gly Asp Pro Lys Lys Pro Arg Gly Lys Met Ser Ser Tyr
1          5          10          15

Ala Phe Phe Val Gln Thr Cys Arg Glu Glu His Lys Lys Lys His Pro
          20          25          30

Asp Ala Ser Val Asn Phe Ser Glu Phe Ser Lys Lys Cys Ser Glu Arg
          35          40          45

Trp Lys Thr Met Ser Ser Lys Glu Lys Gly Lys Phe Glu Asp Met Ala
          50          55          60

Lys Ala Asp Lys Leu Arg Tyr Glu Lys Glu Met Lys Asn Tyr Val Pro
          65          70          75          80

Pro Lys Gly Glu Thr Lys Lys Lys Phe Lys Asp Pro Asn Ala Pro Lys
          85          90          95

Arg Pro Pro Ser Ala Phe Phe Leu Phe Cys Ser Glu Phe Arg Pro Lys
          100          105          110

Ile Lys Gly Glu His Pro Gly Leu Ser Ile Gly Asp Val Ala Lys Lys
          115          120          125

Leu Gly Glu Met Trp Asn Asn Thr Ala Ala Asp Asp Lys Gln Pro Tyr
          130          135          140

Glu Lys Lys Ala Ala Lys Leu Lys Glu Lys Tyr Glu Lys Asp Ile Ala
          145          150          155          160

Ala Tyr Arg Ala Lys Gly Lys Val Asp Ala Gly Lys Lys Val Val Ala
          165          170          175

Lys Ala Glu Lys Ser Lys Lys Lys Lys Glu Glu Glu Glu Asp
          180          185          190

<210> 19
<211> 111
<212> БЕЛОК
<213> искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетический пептид: BS/AI/CD154 = HA/NP/M2e/cCD154: SSS сериновый
спейсер

<400> 19
Ser Ser Ser Thr Tyr Gln Arg Thr Arg Ala Leu Val Arg Thr Gly Met
1          5          10          15

Asp Ser Ser Ser Ala Asn Pro Ala Asn Asp Leu Cys Tyr Pro Gly Asp

```

023058

20 25 30
 Phe Asn Asp Tyr Glu Glu Leu Ser Ser Ser Gly Arg Leu Ile Gln Asn
 35 40 45
 Ser Ile Thr Ile Glu Arg Met Val Leu Ser Ser Ser Ser Leu Leu Ser
 50 55 60
 Arg Ile Asn His Phe Glu Lys Ile Gln Ser Ser Ser Glu Val Glu Thr
 65 70 75 80
 Pro Ile Arg Asn Ser Ser Ser Glu Val Glu Thr Pro Thr Arg Asn Ser
 85 90 95
 Ser Ser Trp Met Thr Thr Ser Tyr Ala Pro Thr Ser Ser Ser Ser
 100 105 110
 <210> 20
 <211> 302
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Синтетический пептид: BS/AI/HMGB1 = HA/NP/M2e/HMGB1
 <400> 20
 Ser Ser Ser Thr Tyr Gln Arg Thr Arg Ala Leu Val Arg Thr Gly Met
 1 5 10 15
 Asp Ser Ser Ser Ala Asn Pro Ala Asn Asp Leu Cys Tyr Pro Gly Asp
 20 25 30
 Phe Asn Asp Tyr Glu Glu Leu Ser Ser Ser Gly Arg Leu Ile Gln Asn
 35 40 45
 Ser Ile Thr Ile Glu Arg Met Val Leu Ser Ser Ser Leu Leu Ser
 50 55 60
 Arg Ile Asn His Phe Glu Lys Ile Gln Ser Ser Ser Glu Val Glu Thr
 65 70 75 80
 Pro Ile Arg Asn Ser Ser Ser Glu Val Glu Thr Pro Thr Arg Asn Ser
 85 90 95
 Ser Ser Trp Met Thr Thr Ser Tyr Ala Pro Thr Ser Ser Ser Ser Ser
 100 105 110
 Met Gly Lys Gly Asp Pro Lys Lys Pro Arg Gly Lys Met Ser Ser Tyr
 115 120 125
 Ala Phe Phe Val Gln Thr Cys Arg Glu Glu His Lys Lys Lys His Pro
 130 135 140
 Asp Ala Ser Val Asn Phe Ser Glu Phe Ser Lys Lys Cys Ser Glu Arg
 145 150 155 160
 Trp Lys Thr Met Ser Ser Lys Glu Lys Gly Lys Phe Glu Asp Met Ala
 165 170 175
 Lys Ala Asp Lys Leu Arg Tyr Glu Lys Glu Met Lys Asn Tyr Val Pro
 180 185 190
 Pro Lys Gly Glu Thr Lys Lys Lys Phe Lys Asp Pro Asn Ala Pro Lys
 195 200 205
 Arg Pro Pro Ser Ala Phe Phe Leu Phe Cys Ser Glu Phe Arg Pro Lys
 210 215 220
 Ile Lys Gly Glu His Pro Gly Leu Ser Ile Gly Asp Val Ala Lys Lys
 225 230 235 240
 Leu Gly Glu Met Trp Asn Asn Thr Ala Ala Asp Asp Lys Gln Pro Tyr
 245 250 255
 Glu Lys Lys Ala Ala Lys Leu Lys Glu Lys Tyr Glu Lys Asp Ile Ala
 260 265 270
 Ala Tyr Arg Ala Lys Gly Lys Val Asp Ala Gly Lys Lys Val Val Ala
 275 280 285
 Lys Ala Glu Lys Ser Lys Lys Lys Lys Glu Glu Glu Glu Asp
 290 295 300
 <210> 21
 <211> 111
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Синтетический пептид: BS/AI/CD154
 <400> 21
 Ser Ser Ser Thr Tyr Gln Arg Thr Arg Ala Leu Val Arg Thr Gly Met
 1 5 10 15
 Asp Ser Ser Ser Ala Asn Pro Ala Asn Asp Leu Cys Tyr Pro Gly Asp
 20 25 30
 Phe Asn Asp Tyr Glu Glu Leu Ser Ser Ser Gly Arg Leu Ile Gln Asn

023058

35 40 45

Ser Ile Thr Ile Glu Arg Met Val Leu Ser Ser Ser Ser Leu Leu Ser
50 55 60

Arg Ile Asn His Phe Glu Lys Ile Gln Ser Ser Ser Glu Val Glu Thr
65 70 75 80

Pro Ile Arg Asn Ser Ser Ser Glu Val Glu Thr Pro Thr Arg Asn Ser
85 90 95

Ser Ser Trp Met Thr Thr Ser Tyr Ala Pro Thr Ser Ser Ser Ser
100 105 110

<210> 22
<211> 290
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетический пептид: BS/AI/HMGBl

<400> 22

Ser Ser Ser Thr Tyr Gln Arg Thr Arg Ala Leu Val Arg Thr Gly Met
1 5 10 15

Asp Ser Ser Ser Ala Asn Pro Ala Asn Asp Leu Cys Tyr Pro Gly Asp
20 25 30

Phe Asn Asp Tyr Glu Glu Leu Ser Ser Ser Gly Arg Leu Ile Gln Asn
35 40 45

Ser Ile Thr Ile Glu Arg Met Val Leu Ser Ser Ser Ser Leu Leu Ser
50 55 60

Arg Ile Asn His Phe Glu Lys Ile Gln Ser Ser Ser Glu Val Glu Thr
65 70 75 80

Pro Ile Arg Asn Ser Ser Ser Glu Val Glu Thr Pro Thr Arg Asn Ser
85 90 95

Ser Ser Ser Ser Met Gly Lys Gly Asp Pro Lys Lys Pro Arg Gly Lys
100 105 110

Met Ser Ser Tyr Ala Phe Phe Val Gln Thr Cys Arg Glu Glu His Lys
115 120 125

Lys Lys His Pro Asp Ala Ser Val Asn Phe Ser Glu Phe Ser Lys Lys
130 135 140

Cys Ser Glu Arg Trp Lys Thr Met Ser Ser Lys Glu Lys Gly Lys Phe
145 150 155 160

Glu Asp Met Ala Lys Ala Asp Lys Leu Arg Tyr Glu Lys Glu Met Lys
165 170 175

Asn Tyr Val Pro Pro Lys Gly Glu Thr Lys Lys Lys Phe Lys Asp Pro
180 185 190

Asn Ala Pro Lys Arg Pro Pro Ser Ala Phe Phe Leu Phe Cys Ser Glu
195 200 205

Phe Arg Pro Lys Ile Lys Gly Glu His Pro Gly Leu Ser Ile Gly Asp
210 215 220

Val Ala Lys Lys Leu Gly Glu Met Trp Asn Asn Thr Ala Ala Asp Asp
225 230 235 240

Lys Gln Pro Tyr Glu Lys Lys Ala Ala Lys Leu Lys Glu Lys Tyr Glu
245 250 255

Lys Asp Ile Ala Ala Tyr Arg Ala Lys Gly Lys Val Asp Ala Gly Lys
260 265 270

Lys Val Val Ala Lys Ala Glu Lys Ser Lys Lys Lys Lys Glu Glu Glu
275 280 285

Glu Asp
290

<210> 23
<211> 85
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетический пептид: HMGBl блок a1

<400> 23

Met Gly Lys Gly Asp Pro Lys Lys Pro Arg Gly Lys Met Ser Ser Tyr
1 5 10 15

Ala Phe Phe Val Gln Thr Cys Arg Glu Glu His Lys Lys Lys His Pro
20 25 30

Asp Ala Ser Val Asn Phe Ser Glu Phe Ser Lys Lys Cys Ser Glu Arg
35 40 45

Trp Lys Thr Met Ser Ser Lys Glu Lys Gly Lys Phe Glu Asp Met Ala

50 55 60

Lys Ala Asp Lys Leu Arg Tyr Glu Lys Glu Met Lys Asn Tyr Val Pro
65 70 75 80

Pro Lys Gly Glu Thr
85

<210> 24
<211> 54
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетический пептид: HMGB1 блок a2

<400> 24

Pro Asp Ala Ser Val Asn Phe Ser Glu Phe Ser Lys Lys Cys Ser Glu
1 5 10 15

Arg Trp Lys Thr Met Ser Ser Lys Glu Lys Gly Lys Phe Glu Asp Met
20 25 30

Ala Lys Ala Asp Lys Leu Arg Tyr Glu Lys Glu Met Lys Asn Tyr Val
35 40 45

Pro Pro Lys Gly Glu Thr
50

<210> 25
<211> 73
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетический пептид: HMGB1 блок b1

<400> 25

Lys Asp Pro Asn Ala Pro Lys Arg Pro Pro Ser Ala Phe Phe Leu Phe
1 5 10 15

Cys Ser Glu Phe Arg Pro Lys Ile Lys Gly Glu His Pro Gly Leu Ser
20 25 30

Ile Gly Asp Val Ala Lys Lys Leu Gly Glu Met Trp Asn Asn Thr Ala
35 40 45

Ala Asp Asp Lys Gln Pro Tyr Glu Lys Lys Ala Ala Lys Leu Lys Glu
50 55 60

Lys Tyr Glu Lys Asp Ile Ala Ala Tyr

65 70

<210> 26
<211> 69
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетический пептид: HMGB1 блок b2

<400> 26

Asn Ala Pro Lys Arg Pro Pro Ser Ala Phe Phe Leu Phe Cys Ser Glu
1 5 10 15

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

Val Ala Lys Lys Leu Gly Glu Met Trp Asn Asn Thr Ala Ala Asp Asp
35 40 45

Lys Gln Pro Tyr Glu Lys Lys Ala Ala Lys Leu Lys Glu Lys Tyr Glu
50 55 60

Lys Asp Ile Ala Ala
65

<210> 27
<211> 21
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетический пептид: HMGB1 RAGE-связывающий домен

<400> 27

Lys Asp Pro Asn Ala Pro Lys Arg Pro Pro Ser Ala Phe Phe Leu Phe
1 5 10 15

Cys Ser Glu Phe Arg
20

<210> 28
<211> 33
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетический пептид: домен провоспалительной кинетической активности HMGB1

<400> 28

Leu Lys Glu Lys Tyr Glu Lys Asp Ile Ala Ala Tyr Arg Ala Lys Gly
1 5 10 15

023058

Lys Val Asp Ala Gly Lys Lys Val Val Ala Lys Ala Glu Lys Ser Lys
 20 25 30

Lys

<210> 29
 <211> 215
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> HMGB1

<400> 29

Met Gly Lys Gly Asp Pro Lys Lys Pro Arg Gly Lys Met Ser Ser Tyr
 1 5 10 15

Ala Phe Phe Val Gln Thr Cys Arg Glu Glu His Lys Lys Lys His Pro
 20 25 30

Asp Ala Ser Val Asn Phe Ser Glu Phe Ser Lys Lys Cys Ser Glu Arg
 35 40 45

Trp Lys Thr Met Ser Ala Lys Glu Lys Gly Lys Phe Glu Asp Met Ala
 50 55 60

Lys Ala Asp Lys Ala Arg Tyr Glu Arg Glu Met Lys Thr Tyr Ile Pro
 65 70 75 80

Pro Lys Gly Glu Thr Lys Lys Lys Phe Lys Asp Pro Asn Ala Pro Lys
 85 90 95

Arg Pro Pro Ser Ala Phe Phe Leu Phe Cys Ser Glu Tyr Arg Pro Lys
 100 105 110

Ile Lys Gly Glu His Pro Gly Leu Ser Ile Gly Asp Val Ala Lys Lys
 115 120 125

Leu Gly Glu Met Trp Asn Asn Thr Ala Ala Asp Asp Lys Gln Pro Tyr
 130 135 140

Glu Lys Lys Ala Ala Lys Leu Lys Glu Lys Tyr Glu Lys Asp Ile Ala
 145 150 155 160

Ala Tyr Arg Ala Lys Gly Lys Pro Asp Ala Ala Lys Lys Gly Val Val
 165 170 175

Lys Ala Glu Lys Ser Lys Lys Lys Lys Glu Glu Glu Glu Asp Glu Glu
 180 185 190

Asp Glu Glu Asp Glu Glu Glu Glu Asp Glu Glu Asp Glu Asp Glu
 195 200 205

Glu Glu Asp Asp Asp Asp Glu
 210 215

<210> 30
 <211> 205
 <212> БЕЛОК
 <213> Danio rerio

<220>
 <221> misc_feature
 <223> HMGB1 полосатого данио

<400> 30

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

Tyr Phe Val Gln Thr Cys Arg Glu Glu His Lys Lys Lys His Pro Glu
 20 25 30

Ala Thr Val Asn Phe Ser Glu Phe Ser Lys Lys Cys Ser Glu Arg Trp
 35 40 45

Lys Thr Met Ser Ala Lys Glu Lys Gly Lys Phe Glu Asp Met Ala Lys
 50 55 60

Leu Asp Lys Ala Arg Tyr Glu Arg Glu Met Lys Asn Tyr Ile Pro Pro
 65 70 75 80

Lys Gly Glu Lys Lys Lys Arg Phe Lys Asp Pro Asn Ala Pro Lys Arg
 85 90 95

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

Lys Glu Glu Thr Pro Gly Leu Ser Ile Gly Asp Val Ala Lys Arg Leu
 115 120 125

Gly Glu Met Trp Asn Lys Ile Ser Ser Glu Glu Lys Gln Pro Tyr Glu
 130 135 140

Lys Lys Ala Ala Lys Leu Lys Glu Lys Tyr Glu Lys Asp Ile Ala Ala
 145 150 155 160

023058

Tyr Arg Ser Lys Gly Lys Val Gly Gly Ala Ala Lys Ala Pro Ser
 165 170 175
 Lys Pro Asp Lys Ala Asn Asp Glu Asp Glu Asp Asp Asp Glu Glu Glu
 180 185 190
 Asp Glu Asp Asp Asp Asp Glu Glu Glu Asp Asp Glu
 195 200 205

<210> 31
 <211> 53
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Синтетический праймер: mazF прямой - MazF ген
 <400> 31
 ctaaaatctt cagatgatca atcattctca ctgcccctt tccagtcggg aaa 53

<210> 32
 <211> 44
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Синтетический праймер: mazF обратный - MazF ген
 <400> 32
 tgaactgtac gaacgaccag attccocct atgcaagggt ttat 44

<210> 33
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Синтетический праймер: 5' CotB прямой - 5' CotB
 <400> 33
 gaaatgctcg atgctgatga 20

<210> 34
 <211> 27
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Синтетический праймер: 5' CotB обратный - 5' CotB
 <400> 34
 ggatgattga tcatctgaag attttag 27

<210> 35
 <211> 24
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Синтетический праймер: 3' CotB прямой - 3' CotB
 <400> 35
 aaatctggtc gttctcaccg ttca 24

<210> 36
 <211> 25
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Синтетический праймер: 3' CotB обратный - 3' CotB
 <400> 36
 ttactttcc agtgatgtc tctcg 25

<210> 37
 <211> 186
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Синтетический праймер: BS/AI/HMGB1 прямой - BS/AI/HMGB1 5' CotB
 <400> 37
 aaccattctt tcaattgtaa ttgaatttg aatcagctcg cctgatgatg acagttcttc 60
 ataatcatta aaatgcccg gatagcacag atcatttgc ggatttgctg atgatgaac 120
 catgcctggt ctaaccagtg ctctgttct ttgatatggt gatgattgat catctgaaga 180
 ttttag 186

<210> 38
 <211> 200
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Синтетический праймер: BS/AI/HMGB1 обратный - BS/AI/HMGB1 3' CotB
 <400> 38
 ttacaattga aagaatggtt ctgtcatcat catcactgct gtcaagaatt aatcattttg 60
 aaaaaattca atcatcatca gaagtgaaa caccgattag aaattcatca tcatggatga 120
 caacatcata tgcaccgaca tcatcatcat cagaagtga aacaccgatt agaataaat 180
 ctggtcgttc gtcacgttca 200

<210> 39
 <211> 177
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>

<223> Синтетический праймер: BS/AI/CD154 прямой - BS/AI/CD154 5' CotB
<400> 39
ttcaaatga ttaattcttg acagcagtga tgatgatgac agaaccattc ttcaattgt 60
aattgaattt tgaatcagtc tgcttgatga tgacagttct tcataatcat taaaatgcc 120
cggatagcac agatcatttg ccggatttgc ggatgattga tcactgaag attttag 177

<210> 40
<211> 194
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетический праймер: BS/AI/CD154 обратный - BS/AI/CD154 3' CotB
<400> 40
caagaattaa tcattttgaa aaaattcaat catcatcaga agttgaaaca cagattagaa 60
attcatcacc actgaaagaa aaatatgaaa aagatattgc agcatataga gcaaaaggca 120
aagttgatgc aggcaaaaaa gttgttgcaa aagcagaaaa atcaaaaaaa aaatctggtc 180
gttcgtcaag ttca 194

