



**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,  
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ**(21)(22) Заявка: **2008114624/10, 27.09.2006**(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
**27.09.2006**

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:  
**27.09.2005 US 60/721,199**(43) Дата публикации заявки: **10.11.2009** Бюл. № 31(45) Опубликовано: **10.02.2011** Бюл. № 4(56) Список документов, цитированных в отчете о  
поиске: **WO 2004067023 A2, 12.08.2004. RU 2193065**  
**C2, 20.11.2002.**(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на  
национальной фазе: **28.04.2008**(86) Заявка РСТ:  
**EP 2006/009359 (27.09.2006)**(87) Публикация заявки РСТ:  
**WO 2007/039192 (12.04.2007)**

Адрес для переписки:

**191186, Санкт-Петербург, а/я 230, "АРС-  
ПАТЕНТ", пат.пов. И.И.Липатовой,  
рег.№ 554**

(72) Автор(ы):

**ДЖИЛЛИЗ Стефен Д. (US),  
ХЕТТМАНН Тор А. О. (DE),  
СТЕЙН Паскаль Андре (US),  
КЛАЙНЦ Стефан Джи (US)**

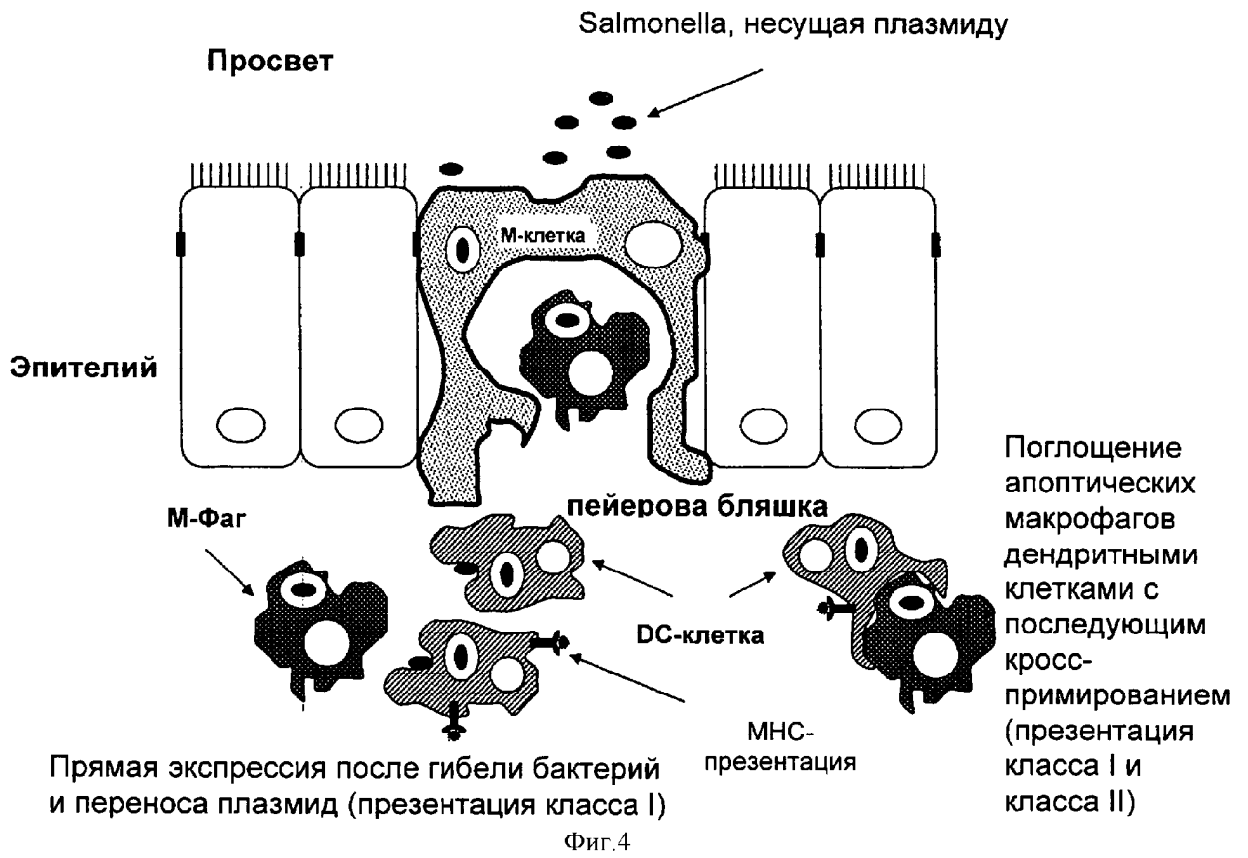
(73) Патентообладатель(и):

**МЕРК ПАТЕНТ ГМБХ (DE)****(54) КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ОПУХОЛЕЙ, ПРЕЗЕНТИРУЮЩИХ  
АНТИГЕНЫ СУРВИВИНА**

(57) Реферат:

Изобретение относится к биотехнологии. Описана вакцина, вызывающая у человека иммунный ответ на сурвивин человека, содержащая пептид или нуклеиновую кислоту, кодирующую пептид, происходящий от мутированного сурвивина курицы, содержащего В1R-домен, имеющий 50%-90% аминокислотную идентичность В1R-домену, располагающемуся от Asp16 до Leu87 в

сурвивине человека и содержащему мутации N97E, T99M, V100L и Q101G, которые способствуют презентации антигена Т-клеткам путем связывания с молекулами МНС, причем указанный пептид возможно слит с Fc-группировкой. Изобретение расширяет арсенал средств для лечения опухолей, сверхэкспрессирующих сурвивин. 3 н. и 14 з.п. ф-лы, 15 ил., 3 табл.



RU 2411040 C2

RU 2411040 C2



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,  
PATENTS AND TRADEMARKS

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21)(22) Application: **2008114624/10, 27.09.2006**

(24) Effective date for property rights:  
**27.09.2006**

Priority:

(30) Priority:  
**27.09.2005 US 60/721,199**

(43) Application published: **10.11.2009 Bull. 31**

(45) Date of publication: **10.02.2011 Bull. 4**

(85) Commencement of national phase: **28.04.2008**

(86) PCT application:  
**EP 2006/009359 (27.09.2006)**

(87) PCT publication:  
**WO 2007/039192 (12.04.2007)**

Mail address:

**191186, Sankt-Peterburg, a/ja 230, "ARS-PATENT", pat.pov. I.I.Lipatovoj, reg.№ 554**

(72) Inventor(s):

**DZhILLIZ Stefen D. (US),  
KhETTMANN Tor A. O. (DE),  
STEJN Paskal' Andre (US),  
KLAJNTs Stefan Dzhi (US)**

(73) Proprietor(s):

**MERK PATENT GMBKh (DE)**

C2

40

40

40

RU

RU 2 4 1 1 0 4 0 C 2

(54) **COMPOSITIONS AND METHODS FOR TREATING TUMOURS PRESENTING SURVIVIN ANTIGENS**

(57) Abstract:

FIELD: medicine, pharmaceuticals.

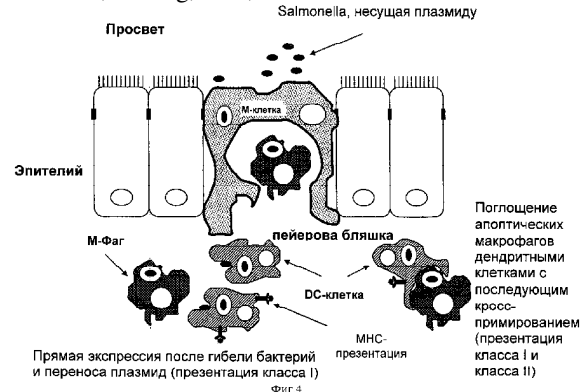
SUBSTANCE: invention refers to biotechnology.

Described is a vaccine eliciting a survivin immune response in an individual, containing peptide or nucleic acid coding peptide originated from mutant hen's survivin containing BIR-domain having 50%-90% amino acid identity to BIR-domain found Asp 16 to Leu87 in human survivin, and containing N97E, T99M, V100L and Q101G mutations which promote the T-cell presentation of an antigen by fixation to MHC molecules, and said peptide is probably fused with Fc-group.

EFFECT: invention extends the range of products

for treating tumours overexpressing survivin.

17 cl, 15 dwg, 3 tbl, 19 ex



Текст описания приведен в факсимильном виде.

## ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

5 Данное изобретение относится к стратегиям вакцинации для лечения  
опухолей. Конкретно, данное изобретение относится к вакцинным композициям,  
стимулирующим у человека иммунный ответ на сурвивин человека и,  
соответственно, атаку опухолевых больных клеток, сверхэкспрессирующих  
10 сурвивин. В частности, настоящее изобретение относится к вакцинным  
композициям, содержащим пептиды, происходящие от сурвивина  
немлекопитающих, а также от модифицированного сурвивина млекопитающих, и  
особенно человека.

## 15 ПРЕДШЕСТВУЮЩИЙ УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Иммунная система выполняет свою надзорную функцию, в частности, путем  
контролирования белкового состава клеток. В ходе процесса, называемого  
20 презентацией антигена Т-клеткам, белки внутри клетки подвергаются процессингу  
с образованием пептидов. Субпопуляция процессированных пептидов, антигенов,  
направляется к клеточной поверхности в специфической ассоциации с одним из  
представителей класса рецепторов, известных как рецепторы главного комплекса  
25 гистосовместимости (МНС). Данные комплексы, МНС-пептид, распознаются  
специализированными иммунными клетками, Т-клетками, посредством  
взаимодействия с поверхностными белками Т-клеток, известными как Т-клеточные  
рецепторы (ТКР). Каждая данная Т-клетка несет на своей поверхности уникальный  
30 ТКР. Продуктивное взаимодействие ТКР Т-клетки с комплексом МНС-пептид  
вызывает иммунный ответ, который приводит к элиминации клетки,  
презентирующей данный конкретный комплекс МНС-пептид. Как правило, данное  
взаимодействие является непродуктивным, если представленные антигены  
35 происходят от хозяина, так называемые "собственные" антигены. Обычно  
иммунные ответы вызываются путем взаимодействия с антигеном, происходящим  
от чужеродного белка, например с антигеном, происходящим от структурного белка  
инфицирующего вируса.

45 Цель лечения опухолей путем активной иммунизации состоит в том, чтобы  
заставить иммунную систему распознавать и элиминировать опухолевые клетки.  
Точно так же, как и в любой другой клетке, антигенные пептиды на опухолевых  
клетках происходят от репертуара экспрессируемых белков. Антигены, которыми

50

5 обогащены опухоли и которые происходят от белков, дифференциально экспрессируемых в опухолях, являются, в принципе, мишенью для иммунного надзора точно так же, как вирусные антигены в инфицированных клетках. Соответственно, было бы полезно использовать средства иммунной системы, которые возникли в ходе эволюционного развития, чтобы противодействовать внутриклеточной инфекции, для элиминации опухоли.

10 Одним из таких белков, которыми обогащены опухоли, является сурвивин. Опухолевые клетки часто сверхэкспрессируют белок сурвивин, который, как считается, блокирует апоптоз и таким образом противодействует механизмам, которые предотвращают аномальный рост опухолевых клеток. С другой стороны, 15 нормальные клетки экспрессируют совсем небольшое количество сурвивина (смотри, например, Ambrosini *et al.*, (1997) Nat. Med., 3:917-921). Поэтому сурвивин представляет собой идеальный опухолеспецифический антиген или антиген, которым обогащены опухоли. Было бы полезно доставлять антигенную форму белка сурвивина антиген-презентирующим клеткам, с тем чтобы мог быть стимулирован иммунный ответ на сурвивин. Однако в отличие от клеток, 20 инфицированных вирусом, сурвивин, подобно многим другим дифференциально экспрессируемым в опухолях белкам, является белком хозяина и не активирует 25 иммунную систему. Поэтому, в данной области техники остается необходимость в разработке эффективных композиций и способов, которые вызывают эффективный иммунный ответ на опухолевые клетки, в особенности те, которые характеризуются 30 сверхэкспрессией сурвивина.

#### КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

35 В настоящем изобретении предложены эффективные композиции и способы, которые вызывают эффективный иммунный ответ на опухолевые клетки. Конкретно, в настоящем изобретении предложены стратегии вакцинации, использующие в качестве Т-клеточных антигенов антигенные формы белков, 40 которыми обогащены опухоли. В частности, в настоящем изобретении предложена антигенная форма сурвивина, белка, которым обогащены опухоли.

45 Соответственно, в одном аспекте настоящее изобретение относится к вакцине, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую по меньшей мере пептид, происходящий от сурвивина немлекопитающих. Альтернативно, настоящее изобретение относится к вакцине, содержащей по меньшей мере пептид, происходящий от сурвивина немлекопитающих. "Сурвивин немлекопитающих" в 50 контексте данного описания включает по меньшей мере любой белок сурвивин,

5 имеющий BIR-домен (повторяющийся домен бакуловирального ингибитора апоптоза) (или IAP-домен (домен белков-ингибиторов апоптоза)), показывающий более чем 50% аминокислотную идентичность, но менее чем 90% аминокислотную  
10 идентичность BIR-домену сурвивина человека, например по меньшей мере 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80% или 85% идентичность BIR-домену сурвивина человека. "Сурвивин немлекопитающих" также включает любой белок сурвивин, идентифицированный в видах немлекопитающих, известных среднему  
15 специалисту в данной области техники. "Пептид" в контексте данного описания включает пептиды, содержащие любое количество аминокислот, включая непроцессированный белок сурвивин. В частности, пептид может содержать по меньшей мере 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30 или более аминокислот.

20 В одном предпочтительном воплощении вакцина по настоящему изобретению содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую пептид, происходящий от сурвивина немлекопитающих. Данная нуклеиновая кислота может включать промотор млекопитающих. В одном воплощении нуклеиновая кислота представляет собой голую ДНК (naked DNA). В другом воплощении нуклеиновая  
25 кислота приготовлена в виде препарата с реагентом, который повышает трансфекцию клеток млекопитающих. Вакцина по настоящему изобретению также может содержать адъювант.

30 В одном воплощении данная нуклеиновая кислота представляет собой часть вирусной частицы, например аденовирусной частицы. Аденовирусные частицы, подходящие для изобретения, включают аденовирусные частицы, происходящие от аденовирусов, способных реплицироваться, или аденовирусные частицы, происходящие от условно реплицирующихся аденовирусов ("CRAD"),  
35 которые реплицируются только в определенных клетках или только при определенных условиях, или аденовирусные частицы, происходящие от аденовирусов, которые являются некомпетентными по репликации. Другие подходящие вирусные частицы включают вирусные частицы, происходящие от  
40 лентивирусов или других РНК-вирусов, аденоассоциированных вирусов, ротавирусов или вирусов осповакцины и многих других, но не ограничены ими.

45 В одном воплощении вакцина содержит бактерию, содержащую данную нуклеиновую кислоту. Предпочтительно эта бактерия представляет собой энтеробактерию, такую как *Salmonella*, *Escherichia* или *Klebsiella*. Другие бактерии, такие как виды *Listeria*, также могут быть использованы в качестве носителя таких нуклеиновых кислот. Бактерия может представлять собой бактерию дикого типа  
50 или может содержать мутации, которые, например, ослабляют ее патогенность.

Обычно предпочтительно использовать мутантную форму бактерии, такую как ауксотроф.

5 В другом предпочтительном воплощении вакцина по настоящему изобретению кодирует или содержит пептид, происходящий от сурвивина немлекопитающих. Предпочтительно, пептид, происходящий от сурвивина немлекопитающих, включает BIR-домен. Обычно данный BIR-домен, 10 происходящий от сурвивина немлекопитающих, имеет более чем 50% аминокислотную идентичность, но менее чем 80% аминокислотную идентичность BIR-домену сурвивина человека. Сурвивин немлекопитающих происходит от птицы, рыбы, рептилии, амфибии или другого позвоночного. В предпочтительном 15 воплощении сурвивин немлекопитающих происходит от курицы.

В некоторых воплощениях вакцина по настоящему изобретению кодирует или содержит пептид, происходящий от сурвивина немлекопитающих, с мутацией, 20 которая способствует презентации антигена Т-клеткам. Например, мутантный пептид сурвивина немлекопитающих может содержать аминокислотную замену в позиции, соответствующей Asn97, Thr99, Val100 или Gln101 сурвивина человека. Более конкретно, сурвивин немлекопитающих, происходящий от курицы или других 25 видов, может содержать одну из следующих аминокислотных замен: N97E, T99M, V100L или Q101G. В качестве другого примера, пептид, происходящий от SIX сурвивина лягушки, содержит замены в эквивалентных позициях Thr110 и/или Ser112. В качестве конкретного примера, пептид, происходящий от SIX сурвивина лягушки, содержит замены Thr110Met и/или Ser112Gly. 30

В других воплощениях вакцина по настоящему изобретению кодирует или содержит пептид, происходящий от сурвивина немлекопитающих, с мутацией, 35 которая потенциально может уничтожать биологическую активность BIR-домена. Например, пептид, происходящий от сурвивина немлекопитающих, может содержать по меньшей мере одну аминокислотную замену в позиции, соответствующей Arg18, Cys57, Cys60, His77 или Cys84 сурвивина человека. 40

Кроме того, сурвивин немлекопитающих возможно может содержать аминокислотные делеции. В качестве одного примера, группировка сурвивина немлекопитающих содержит С-концевую делецию. В качестве другого примера, сурвивин немлекопитающих содержит N-концевую делецию. 45

В других воплощениях вакцина по настоящему изобретению способна активировать Т-клетки, распознающие последовательность пептида сурвивина человека в комплексе с молекулой МНС на раковой клетке. Конкретно, такой 50 последовательностью пептида сурвивина человека может являться, например,

LTLGEFLKL (SEQ ID NO: 1), CPTENEPDL (SEQ ID NO: 2) или EPDLAQCF (SEQ ID NO: 3).

5 В некоторых воплощениях пептид, происходящий от сурвивина немлекопитающих, слит или конъюгирован с Fc-группировкой. Предпочтительная Fc-группировка происходит от Fc-области млекопитающих, более предпочтительно от Fc-области человека. Fc-группировка может содержать мутации, которые  
10 улучшают сборку, например замену цистеина на серин в последовательности EPKSCDK (SEQ ID NO: 4) шарнирной области IgG1. В результате Fc-группировка может содержать модифицированную последовательность EPKSSDK (SEQ ID NO: 5). Fc-группировка также может содержать мутации, которые уменьшают  
15 иммуногенность областей, в отношении которых иммунный ответ является нежелательным, например области соединения группировок слитого белка.

В некоторых воплощениях пептид, происходящий от сурвивина немлекопитающих, функционирует во взаимодействии с эффекторной молекулой,  
20 которая способствует иммунному ответу. Такой эффекторной молекулой может являться, например, молекула цитокина, включающая IL-2, IL-7, IL-12, IL-18, IL-21, IL-23, GM-CSF (гранулоцит-макрофаг-колониестимулирующий фактор) или любой  
25 другой цитокин, в особенности цитокин, способный вызывать иммунный ответ Th1-типа, но не ограниченная ими. Такой эффекторной молекулой также может являться ингибитор цитокина, который подавляет иммунную систему, например STAT3-ингибитор (например доминантно-негативный STAT3-белок, такой как STAT3 $\beta$ ). Цитокины или другие эффекторные молекулы также могут содержать  
30 мутации. Например, цитокин может содержать замену на Ser в позиции, соответствующей Cys125 в IL-2.

35 Соответственно, в предпочтительных воплощениях вакцина по изобретению содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую пептид, происходящий от сурвивина немлекопитающих, и второй пептид, включающий эффекторную молекулу, описанную выше, которая способствует иммунному ответу. Области, кодирующие  
40 пептид сурвивина немлекопитающих и пептид эффекторной молекулы, могут находиться в одной транскрипционной единице или в двух отдельных транскрипционных единицах. Альтернативно вакцина по изобретению содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую пептид, происходящий от сурвивина немлекопитающих, и отдельную нуклеиновую кислоту, кодирующую второй пептид,  
45 включающий эффекторную молекулу, описанную выше, которая способствует иммунному ответу.

50

В других воплощениях вакцина по изобретению содержит пептид, происходящий от сурвивина немлекопитающих, и второй пептид, включающий эффекторную молекулу, описанную выше, которая способствует иммунному ответу. В одном воплощении пептид, происходящий от сурвивина немлекопитающих, слит или конъюгирован с пептидом, включающим эффекторную молекулу. Данный слитый белок сурвивина немлекопитающих и эффекторной молекулы может быть дополнительно слит или конъюгирован с Fc-группировкой, такой, как описано выше.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к вакцине, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую пептид модифицированного сурвивина млекопитающих. Альтернативно, настоящее изобретение относится к вакцине, содержащей пептид модифицированного сурвивина млекопитающих. Данный пептид модифицированного сурвивина млекопитающих является биологически инертным, но иммунологически по существу аналогичным сурвивину млекопитающих. В контексте данного описания "биологически инертный" означает пептид сурвивина, который по существу не способен проявлять активность, обычно ассоциируемую с нормальным сурвивином, или влиять на эту активность. Например, "биологически инертный" пептид сурвивина не обладает существенной антиапоптической активностью и по существу не способен влиять на антиапоптическую активность, обычно ассоциируемую с эндогенным белком сурвивином. Биологически инертный сурвивин обычно не оказывает существенного доминантно-негативного действия. В контексте данного описания "иммунологически по существу аналогичный сурвивину млекопитающих" означает пептид модифицированного сурвивина, способный вызывать по меньшей мере такой же иммунный ответ на одну и ту же последовательность-мишень, что и соответствующий пептид немодифицированного сурвивина млекопитающих. Иммунный ответ можно оценить, например, по численности популяции CD8<sup>+</sup> Т-клеток или по высвобождению  $\gamma$ -ИФ ( $\gamma$ -интерферона) CD8<sup>+</sup> Т-клетками в ответ на последовательность-мишень.

В одном предпочтительном воплощении вакцина по изобретению содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую пептид модифицированного сурвивина млекопитающих. Данная нуклеиновая кислота может включать промотор млекопитающих. В одном воплощении нуклеиновая кислота представляет собой голую ДНК. В другом воплощении нуклеиновая кислота приготовлена в виде препарата с реагентом, который повышает трансфекцию клеток млекопитающих. Вакцина по настоящему изобретению также может содержать адъювант.

В одном воплощении нуклеиновая кислота, кодирующая пептид модифицированного сурвивина млекопитающих, представляет собой часть вирусной частицы, например аденовирусной частицы. Аденовирусные частицы, подходящие для изобретения, включают аденовирусные частицы, происходящие от аденовирусов, способных реплицироваться, или аденовирусные частицы, происходящие от условно реплицирующихся аденовирусов ("CRAD"), которые реплицируются только в определенных клетках или только при определенных условиях, или аденовирусные частицы, происходящие от аденовирусов, которые являются некомпетентными по репликации. Другие подходящие вирусные частицы включают вирусные частицы, происходящие от лентивирусов или других РНК-вирусов, аденоассоциированных вирусов, ротавирусов или вирусов осповакцины и многих других, но не ограничены ими.

В одном воплощении вакцина содержит бактерию, содержащую нуклеиновую кислоту, кодирующую пептид модифицированного сурвивина млекопитающих. Предпочтительно данная бактерия представляет собой энтеробактерию, такую как *Salmonella*, *Escherichia* или *Klebsiella*. Другие бактерии, такие как виды *Listeria*, также могут быть использованы в качестве носителя таких нуклеиновых кислот. Бактерия может представлять собой бактерию дикого типа или может содержать мутации, которые, например, ослабляют ее патогенность. Обычно предпочтительно использовать мутантную форму бактерии, такую как ауксотроф.

В другом предпочтительном воплощении вакцина по изобретению содержит пептид модифицированного сурвивина млекопитающих. Предпочтительно, пептид модифицированного сурвивина млекопитающих включает модифицированный BIR-домен. Данный модифицированный BIR-домен может содержать по меньшей мере одну аминокислотную замену в позиции, соответствующей Arg18, Cys57, Cys60, His77 и Cys84 сурвивина человека. Альтернативно или дополнительно пептид модифицированного сурвивина млекопитающих включает модифицированный спиральный домен. Данный модифицированный спиральный домен может содержать по меньшей мере одну аминокислотную замену в позиции, соответствующей Lys122, Ala128 и Ile135 сурвивина человека. Например, модифицированный спиральный домен может содержать Pro в позиции, соответствующей Ala128 сурвивина человека. Модифицированный спиральный домен также может содержать Pro в позиции, соответствующей Ile135. Пептид модифицированного сурвивина млекопитающих предпочтительно содержит один или более чем один Т-клеточный эпитоп MHC класса I. Например, пептид

модифицированного сурвивина млекопитающих может включать аминокислотную последовательность LTLGEFLKL (SEQ ID NO: 1) или LMLGEFLKL (SEQ ID NO: 6).

5 В некоторых воплощениях пептид модифицированного сурвивина млекопитающих слит с Fc-группировкой. Предпочтительная Fc-группировка  
10 происходит от Fc-области млекопитающих, более предпочтительно от Fc-области человека. Fc-группировка может содержать мутации, которые улучшают сборку, например замену цистеина на серин в последовательности EPKSCDK (SEQ ID NO: 4) шарнирной области IgG1. В результате Fc-группировка может содержать модифицированную последовательность EPKSSDK (SEQ ID NO: 5). Fc-группировка также может содержать мутации, которые уменьшают иммуногенность областей, в  
15 отношении которых иммунный ответ является нежелательным, например области соединения группировок слитого белка.

В некоторых воплощениях пептид модифицированного сурвивина млекопитающих функционирует во взаимодействии с эффекторной молекулой,  
20 которая способствует иммунному ответу. Такой эффекторной молекулой может являться, например, молекула цитокина, включающая IL-2, IL-7, IL-12, IL-18, IL-21, IL-23, GM-CSF или любой другой цитокин, в особенности цитокин, способный вызывать иммунный ответ Th1-типа, но не ограниченная ими. Такой эффекторной молекулой также может являться ингибитор цитокина, который подавляет  
25 иммунную систему, например STAT3-ингибитор (например доминантно-негативный STAT3-белок, такой как STAT3 $\beta$ ). Цитокины или другие эффекторные молекулы также могут содержать мутации. Например, цитокин может содержать замену на Ser в позиции, соответствующей Cys125 в IL-2.

Соответственно, в предпочтительных воплощениях вакцина по изобретению  
35 содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую пептид модифицированного сурвивина млекопитающих и второй пептид, включающий эффекторную молекулу, описанную выше, которая способствует иммунному ответу. Области, кодирующие пептид модифицированного сурвивина млекопитающих и пептид эффекторной молекулы, могут находиться в одной транскрипционной единице, или в двух  
40 отдельных транскрипционных единицах. Альтернативно вакцина по изобретению содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую пептид модифицированного сурвивина млекопитающих, и отдельную нуклеиновую кислоту, кодирующую второй пептид, включающий эффекторную молекулу, описанную выше, которая способствует иммунному ответу.  
45

В других воплощениях вакцина по изобретению содержит пептид  
50 модифицированного сурвивина млекопитающих и второй пептид, включающий

5 эффекторную молекулу, описанную выше, которая способствует иммунному ответу. В одном воплощении пептид модифицированного сурвивина млекопитающих слит или конъюгирован с пептидом, включающим эффекторную молекулу. Данный слитый белок пептида модифицированного сурвивина млекопитающих и эффекторной молекулы может быть дополнительно слит или конъюгирован с Fc-группировкой, такой, как описано выше.

10 В другом аспекте настоящее изобретение относится к нуклеиновой кислоте, способной вызывать иммунный ответ, направленный против клеток, экспрессирующих сурвивин человека. Данная нуклеиновая кислота кодирует пептид, включающий аминокислотную последовательность, показывающую более чем 50% идентичность, но менее чем 80% идентичность BIR-домену сурвивина человека, и данная нуклеиновая кислота содержит промотор, способный экспрессировать данный пептид в клетке млекопитающего.

20 Настоящее изобретение также относится к способу лечения, включающему введение вакцины или нуклеиновой кислоты, таких, как описано выше. В частности, в изобретении предложены способы лечения рака и других заболеваний, связанных с нежелательной пролиферацией клеток. Способы лечения по изобретению возможно могут включать другие этапы, например этап первичного исследования опухоли пациента на присутствие высоких уровней экспрессии сурвивина. Другим возможным этапом является предварительное лечение пациента мягким иммунодепрессивным агентом, таким как циклофосфамид в низких дозах, перед введением вакцины или нуклеиновой кислоты по изобретению. Безотносительно к какой-либо теории, один из эффектов такого предварительного лечения состоит в уменьшении количества регуляторных Т-клеток. Поэтому в изобретение включены другие виды предварительного лечения, которые имеют аналогичный эффект.

35 Кроме сурвивина настоящее изобретение можно применять к самым разным белкам, которые могут быть использованы в качестве антигенов, таких как опухолеспецифические антигены, вирусные антигены и другие антигены. Кроме сурвивина к числу опухолеспецифических антигенов, к которым можно применять изобретение, относятся молекулы адгезии эпителиальных клеток, онкогены, такие как Ras, карциноэмбриональный антиген и другие опухолеспецифические белки или белки, которыми обогащены опухоли. К числу вирусных антигенов, к которым можно применять изобретение, относятся р24 ВИЧ, гемагглютинин вируса гриппа и другие вирусные белки.

50 Таким образом, в изобретении предложено следующее:

- Вакцина для применения в лечении опухолевых и связанных с опухолями заболеваний человека, содержащая:

(а) пептид, происходящий от сурвивина немлекопитающих, или нуклеиновую кислоту, кодирующую указанный пептид, где указанный сурвивин немлекопитающих содержит BIR-домен, имеющий 50% - 90% аминокислотную идентичность BIR-домену, которому соответствует область от Asp16 до Leu87 в сурвивине человека, или (б) пептид, происходящий от модифицированного сурвивина млекопитающих, или нуклеиновую кислоту, кодирующую указанный пептид, где указанный модифицированный сурвивин млекопитающих содержит мутацию внутри BIR-домена, которая по существу уничтожает биологическую активность, приписываемую BIR-домену, и (в) возможно адъювант; указанная вакцина вызывает у человека иммунный ответ на сурвивин человека.
- Соответствующая вакцина, где указанный иммунный ответ, вызываемый вакциной, вызывает образование CD8+ Т-клеток, которые атакуют клетки, экспрессирующие сурвивин человека.
- Соответствующая вакцина, где пептид происходит от сурвивина немлекопитающих.
- Соответствующая вакцина, где указанный BIR-домен имеет 50% - 80% аминокислотную идентичность указанному BIR-домену сурвивина человека.
- Соответствующая вакцина, где сурвивин немлекопитающих происходит от птицы, рыбы, рептилии или амфибии, предпочтительно от курицы.
- Соответствующая вакцина, где пептид, происходящий от сурвивина немлекопитающих, содержит одну или более чем одну мутацию, которая способствует презентации антигена Т-клеткам путем связывания с молекулами МНС.
- Соответствующая вакцина, где сурвивин немлекопитающих представляет собой куриный сурвивин и мутация представляет собой аминокислотную замену в одной или более чем одной из позиций Asp97, Thr99, Val100 или Gln101 куриного сурвивина. Предпочтительная мутация представляет собой N97E, и/или T99M, и/или V100L, и/или Q101G.
- Вакцина (SEQ ID NO: 12), где мутация представляет собой N97E, T99M, V100L и Q101G.

- Соответствующая вакцина, где сурвивин немлекопитающих содержит мутацию внутри BIR-домена, которая по существу уничтожает биологическую активность, приписываемую BIR-домену.
- 5 • Соответствующая вакцина, где указанная биологическая активность, которую следует уничтожить, представляет собой апоптоз.
- Соответствующая вакцина, где указанный пептид, происходящий от сурвивина немлекопитающих, содержит аминокислотную замену в одной или более чем одной из позиций, соответствующих Arg18, Pro47, Cys57, 10 Cys60, His77 и Cys84 сурвивина человека.
- Соответствующая вакцина, где вакцина способна активировать Т-клетки, распознающие последовательность пептида сурвивина человека в комплексе с молекулой МНС, указанная последовательность пептида сурвивина человека предпочтительно выбрана из группы пептидов, состоящей из: 15  
LTLGEFLKL, CPTENEPDL и EPDLAQCFF.
- Соответствующая вакцина, где пептид происходит от модифицированного сурвивина млекопитающих, предпочтительно от сурвивина человека. 20
- Соответствующая вакцина, где указанный пептид, происходящий от модифицированного сурвивина человека, содержит аминокислотную замену в одной или более чем одной из позиций Arg18, Pro47, Cys57, Cys60, His77 и Cys84 сурвивина человека. 25
- Соответствующая вакцина, где пептид, происходящий от модифицированного сурвивина млекопитающих, содержит модифицированный спиральный домен и содержит аминокислотную замену в позиции Lys12, и/или Ala128, и/или Ile135 сурвивина человека. 30
- Соответствующая вакцина, где мутация представляет собой по меньшей мере Ala128P и/или Ile135P. 35
- Вакцина (SEQ ID NO: 56), содержащая модифицированный сурвивин человека, имеющий следующие мутации: R18E, P47L, Q56L, H77A, C84A, A128P и I135P. 40
- Соответствующая вакцина, где пептид модифицированного сурвивина млекопитающих содержит аминокислотную последовательность LTLGEFLKL или LMLGEFLKL. 45

50

- Соответствующая вакцина, где пептид, происходящий от сурвивина немлекопитающих, и пептид, происходящий от модифицированного сурвивина млекопитающих, слит с Fc-группировкой.
- 5     • Соответствующая вакцина, где вакцина дополнительно кодирует или содержит пептид, происходящий от эффекторной молекулы, предпочтительно цитокина, выбранного из группы, состоящей из IL-2, IL-7, 10     IL-12, IL-18, IL-21, IL-23 и GM-CSF.
- Соответствующая вакцина, где нуклеиновая кислота, кодирующая пептид, происходящий от сурвивина немлекопитающих или от модифицированного сурвивина млекопитающих, содержит промотор 15     млекопитающих и представляет собой предпочтительно голую ДНК.
- Соответствующая вакцина, где нуклеиновая кислота приготовлена в виде препарата с реагентом, который повышает трансфекцию клеток 20     млекопитающих.
- Соответствующая вакцина, где нуклеиновая кислота представляет собой часть вирусной частицы, предпочтительно аденовирусной частицы.
- Соответствующая вакцина, где вакцина содержит бактерию, 25     содержащую указанную выше нуклеиновую кислоту, где бактерия представляет собой предпочтительно энтеробактерию, более предпочтительно *Salmonella*.
- Фармацевтическая композиция для иммунизации человека против 30     опухолевых клеток, сверхэкспрессирующих сурвивин, содержащая вакцину по любому из пунктов формулы изобретения и определенную в описании изобретения, возможно вместе с приемлемым носителем, разбавителем 35     или эксципиентом.
- Применение соответствующей вакцины для изготовления лекарства для иммунизации пациента против опухолевых клеток, 40     сверхэкспрессирующих сурвивин человека.

#### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

На Фигуре 1 представлено выравнивание белковых последовательностей гомологов сурвивина. Выравнивания выполняли в соответствии с методикой 45     ClustalW (смотри Thompson *et al.* (1994) Nucl. Acid Res. 22:4673-4680). Последовательности получены из базы данных NCBI с использованием следующих регистрационных номеров (Accession number): сурвивин человека 50

(регистрационный номер: NM\_001168, SEQ ID NO: 8), сурвивин собаки (NP\_001003019, SEQ ID NO: 9), сурвивин свиньи (NP\_999306, SEQ ID NO: 39), коровий сурвивин (NP\_001001855, SEQ ID NO: 40), кошачий сурвивин (NP\_001009280, SEQ ID NO: 41), сурвивин мыши (NP\_033819, SEQ ID NO: 10), сурвивин крысы (AAF82586, SEQ ID NO: 42), сурвивин орангутана (CAN91231, SEQ ID NO: 43), куриный сурвивин (NP\_001012318, SEQ ID NO: 11), SIX *Xenopus laevis* (AAO20085, SEQ ID NO: 13), гомолог сурвивина *Xenopus laevis* (AAM76714, SEQ ID NO: 46), гомолог 2 сурвивина *Xenopus laevis* (AAH89271, SEQ ID NO: 47), гомолог сурвивина из сома (CK419466, SEQ ID NO: 52), гомолог сурвивина из полосатого данио (NP\_919378, SEQ ID NO: 48), гомолог 2 сурвивина из полосатого данио (NP\_660196, SEQ ID NO: 49), сурвивин-подобный гомолог рыбы-собаки (CAG04432, SEQ ID NO: 50) и сурвивин-подобный гомолог 2 рыбы-собаки (CAG07433, SEQ ID NO: 51). BIR-домен подчеркнут; звездочки показывают сигнатуры остатков, участвующих в образовании координационных связей с Zn; и тире показывают гэпы в выравнивании. В последовательностях, не относящихся к последовательности человека, остатки, которые идентичны остаткам в последовательности человека, изображены точками; другие остатки изображены с использованием однобуквенного аминокислотного кода.

На Фигуре 2 представлена таблица, в которой приведены проценты аминокислотной идентичности, полученные при сравнении BIR-доменов различных гомологов сурвивина. Последовательность 1 представляет собой последовательность человека; последовательность 2 представляет собой последовательность собаки; последовательность 3 представляет собой последовательность свиньи; последовательность 4 представляет собой последовательность коровы; последовательность 5 представляет собой последовательность кошки; последовательность 6 представляет собой последовательность мыши; последовательность 7 представляет собой последовательность крысы; последовательность 8 представляет собой последовательность орангутана; последовательность 9 представляет собой последовательность курицы; последовательность 10 представляет собой последовательность SIX-белка лягушки *Xenopus laevis*; последовательность 11 представляет собой последовательность гомолога лягушки *Xenopus laevis*; последовательность 12 представляет собой последовательность гомолога 2 лягушки *Xenopus laevis*; последовательность 13 представляет собой последовательность гомолога сома; последовательность 14 представляет собой последовательность гомолога полосатого данио; последовательность 15

представляет собой последовательность гомолога 2 полосатого данио; последовательность 16 представляет собой последовательность сурвивин-подобного белка 1 рыбы-собаки и последовательность 17 представляет собой последовательность сурвивин-подобного белка 2 рыбы-собаки.

На Фигуре 3 представлено выравнивание последовательностей BIR-доменов беспозвоночных и сурвивина человека. Последовательность BIR-домена сурвивина человека соответствует SEQ ID NO: 63. Выравнивания выполняли в соответствии с методикой ClustalW (смотри Thompson *et al.* (1994) Nucl. Acid Res. 22:4673-4680). Последовательности получены из базы данных NCBI с использованием следующих регистрационных номеров: сурвивин человека (NM\_001168, последовательность BIR-домена соответствует SEQ ID NO: 63), *D. melanogaster* (AAF55399, последовательность BIR-домена гомолога соответствует SEQ ID NO: 53) и *C. elegans* (NP\_505949, последовательность BIR-домена гомолога соответствует SEQ ID NO: 54). BIR-домен подчеркнут; звездочки показывают сигнатуры остатков, участвующих в образовании координационных связей с Zn; и тире показывают гэпы в выравнивании. В последовательностях, не относящихся к последовательности человека, остатки, которые идентичны остаткам в последовательности человека, изображены точками; другие остатки изображены с использованием однобуквенного аминокислотного кода.

На Фигуре 4 дано схематическое описание принципов ДНК-вакцинации с использованием *Salmonella*, несущей плазмиды, кодирующей полипептид сурвивина. *Salmonella* в просвете кишечника проникает в эпителий кишечника через М-клетки пейеровых бляшек. После пересечения эпителия *Salmonella* проникает в клетки, такие как макрофаги и дендритные клетки. Гибель бактерий и перенос плазмид открывает возможность для экспрессии плазмиды в макрофагах, что приводит к презентации пептидов кодируемого полипептида сурвивина в комплексе с молекулами МНС класса I. Кроме того, поглощение апоптических макрофагов, экспрессирующих полипептид сурвивина, дендритными клетками приводит к кросс-примированию, являющемуся следствием презентации данных пептидов в комплексе с молекулами МНС класса I и МНС класса II.

На Фигуре 5 представлена гистограмма, показывающая высвобождение  $\gamma$ -ИФ Т-клетками, выделенными из вакцинированных сурвивином мышей, при воздействии раковых клеток. Высвобождение  $\gamma$ -ИФ измеряли с помощью ELISpot-анализа (иммуноферментного спот-анализа). Мышей C57Bl/6 вакцинировали *Salmonella*, несущей плазмиду для экспрессии либо мышинового, либо куриного сурвивина, или не вакцинировали (ось x), и после того, как Т-клетки подвергали

воздействию раковых клеток либо B16/KSA (заштрихованные столбцы), либо LLC/KSA (черные столбцы) линии, измеряли количество  $\gamma$ -ИФ-точек, приходящихся на  $5 \times 10^5$  Т-клеток, внесенных в планшет (ось у).

5 На Фигуре 6 представлена гистограмма, показывающая высвобождение  $\gamma$ -ИФ Т-клетками, выделенными из вакцинированных сурвивином мышей, при  
10 воздействии раковых клеток. Высвобождение  $\gamma$ -ИФ измеряли с помощью ELISpot-анализа. Мышей Balb/c вакцинировали *Salmonella*, несущей плазмиду для экспрессии либо мышинового, либо куриного сурвивина, или не вакцинировали (ось х), и после того, как Т-клетки подвергали воздействию раковых клеток либо 4Т1/KSA (заштрихованные столбцы), либо А20 (черные столбцы) линии, измеряли  
15 количество  $\gamma$ -ИФ-точек, приходящихся на  $5 \times 10^5$  Т-клеток, внесенных в планшет (ось у).

20 На Фигуре 7 представлена кривая выживаемости мышей, вакцинированных куриным сурвивином или мышиним сурвивином с использованием *Salmonella* SL7207. Построен график зависимости количества выживших мышей Balb/c (ось у), выраженного в процентах, от количества суток, прошедших после СТ26/KSA-провокации (ось х), для мышей, вакцинированных либо *Salmonella*, несущей  
25 плазмиду для экспрессии мышинового сурвивина (закрашенные треугольники) или куриного сурвивина (закрашенные квадраты), либо PBS (фосфатно-солевым буфером) (закрашенные ромбы).

30 На Фигуре 8 представлена кривая выживаемости мышей, вакцинированных куриным сурвивином или мышиним сурвивином с использованием *Salmonella* SL7207. Построен график зависимости % выживших мышей C57Bl/6 (ось у) от количества суток, прошедших после LLC/KSA-провокации (ось х), для мышей,  
35 вакцинированных либо *Salmonella*, несущей плазмиду для экспрессии мышинового сурвивина (закрашенные треугольники) или мутантного куриного сурвивина, ChickenSurvivin(N97E, T99M, V100L, Q101G) (закрашенные квадраты), либо PBS (закрашенные ромбы).

40 На Фигуре 9 представлено схематическое описание режима введения доз с целью оценки эффекта режима вакцинации относительно опухолевой провокации на 10-е сутки. "Сут." представляет собой сокращение слова "сутки".  
45 Соответственно, например, одни мыши получали пероральную вакцинацию на 1-е сутки, опухолевую провокацию на 10-е сутки и пероральную вакцинацию на 13-е сутки; другие мыши получали опухолевую провокацию и пероральную вакцинацию на 10-е сутки и повторную пероральную вакцинацию на 18-е сутки. Опухолевую  
50 массу легких оценивали на 29-е сутки.

На Фигуре 10 представлен график, показывающий массу легких у мышей, получавших вакцинацию на 1 и 13-е сутки; 7 и 13-е сутки; 10 и 18-е сутки; или 13 и 21-е сутки; или получавших PBS. Все мыши внутривенно получали опухолевую провокацию клетками LLC/KSA на 10-е сутки. Также приведены оценки метастазирования легких для каждой из мышей.

На Фигуре 11 представлено схематическое описание режима введения доз, включающего *Salmonella*-опосредованную вакцинацию куриным сурвином на 1 и 15-е сутки; внутривенную опухолевую провокацию клетками LLC/KSA на 4-е сутки; и лечение, путем внутривенного введения, циклофосфамидом (CTX) на 11-е сутки и индометацином на 12-15-е сутки. Опухолевую массу легких оценивали на 28-е сутки.

На Фигуре 12 представлен график, показывающий массу легких у мышей, получавших только опухолевую провокацию (носитель); вакцинацию куриным сурвином на 1-е сутки (первичную иммунизацию) и 15-е сутки (повторную иммунизацию) и опухолевую провокацию на 4-е сутки (PCB); CTX и индометацин и опухолевую провокацию C(CI); первичную иммунизацию, провокацию, CTX, индометацин и повторную иммунизацию (PC(CI)B); первичную иммунизацию, провокацию, CTX и индометацин (PC(CI)) или провокацию, CTX, индометацин и повторную иммунизацию C(CI)B. Также приведены оценки метастазирования легких для каждой из мышей.

На Фигуре 13 представлены данные проточной цитометрии клеток периферической крови, демонстрирующие появление у мышей новой популяции CD44<sup>bright</sup>, CD3<sup>low</sup> клеток после вакцинации *Salmonella*, несущей плазмиду, кодирующую сурвивин немлекопитающих. Ось x соответствует CD3 клеткам и ось y соответствует CD44 клеткам.

На Фигуре 14 представлено схематическое описание режима введения доз, включающего подкожную опухолевую провокацию на 1-е сутки; *Salmonella*-опосредованную вакцинацию сурвином немлекопитающих на 4, 11, 18 и 25-е сутки и лечение, путем внутривенного введения, иммуноцитоклином на 8, 9 и 10-е сутки.

На Фигуре 15 представлен график, показывающий изменение объема опухоли на протяжении времени, в течение которого мышей лечили PBS; иммуноцитоклином; сурвином немлекопитающих или иммуноцитоклином и сурвином немлекопитающих.

## ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение улучшает лечение рака или других заболеваний тем, что в нем предложены композиции и способы, которые эффективно вызывают иммунный ответ, направленный против больных клеток. Рак представляет собой основное заболевание, на которое направлено изобретение, хотя изобретение применимо и к другим заболеваниям и состояниям, таким как нежелательная пролиферация нормальных клеток, например фиброзной ткани. Изобретение также предполагает применение композиций и способов в лечении вирусных инфекций, таких как ВИЧ-инфекции (вирус иммунодефицита человека), грипп и другие вирусные инфекции.

В частности, для лечения злокачественных и других опухолей в настоящем изобретении предложены композиции и способы для презентации пептида, относящегося к опухолеспецифическому белку или белку, которым обогащены опухоли, на антиген-презентирующих клетках, с тем чтобы вызвать у млекопитающего адаптивный иммунный ответ, направленный против раковых или опухолевых клеток. Одним из предпочтительных опухолеспецифических антигенов или антигенов, которыми обогащены опухоли, согласно данному изобретению является сурвивин.

*Краткое описание презентации антигенов Т-клеткам*

Презентация антигена представляет собой клеточный процесс, в ходе которого в клетках происходит расщепление белков с образованием пептидов, которые затем транспортируются по секреторному пути на клеточную поверхность. Данные процессированные пептиды транспортируются в виде стабильного комплекса со специализированными пептид-презентирующими мембранными белками, известными как МНС (главный комплекс гистосовместимости). Данный процесс позволяет компонентам иммунной системы, например хелперным Т-клеткам ( $CD4^+$  Т-клеткам) и цитотоксическим Т-клеткам (ЦТЛ (цитотоксическим Т-лимфоцитам) или  $CD8^+$  Т-клеткам), осуществлять надзор за белковым составом клеток путем распознавания комплекса МНС-пептид. Хелперные Т-клетки взаимодействуют с комплексами МНС II-пептид, тогда как цитотоксические Т-клетки взаимодействуют с комплексами МНС I-пептид. Данное взаимодействие осуществляется через Т-клеточный рецептор (ТКР), экспрессированный на поверхности Т-клетки. Каждая Т-клетка экспрессирует уникальный ТКР. Аналогично антителам, разнообразие ТКР создается путем реаранжировки хромосомальных ТКР-локусов. Как и в случае антителообразующих клеток, при встрече с

5 аутоантигеном (то есть с антигенным пептидом, образованным из эндогенного белка, присутствующего в клетке) во время дифференцировки Т-клеток данная конкретная Т-клетка подвергается негативной селекции. Те Т-клетки, которые не  
10 были элиминированы во время негативной селекции в дальнейшем превращаются в зрелые Т-клетки. В итоге, взаимодействие с чужим антигеном в комплексе с МНС приводит к активации Т-клеток, особенно при наличии вторичной стимуляции.

### *Сурвивин*

15 Белок сурвивин характеризуется тем, что имеет консервативный домен, приблизительно 70 аминокислот, известный как BIR-домен (повторяющийся домен бакуловирусного ингибитора апоптоза) (или IAP-домен (домен белков-ингибиторов апоптоза)). В сурвивине человека BIR-домен соответствует области  
20 протяженностью от Asp16 до Leu87. Раковые или опухолевые клетки часто сверхэкспрессируют белок сурвивин, что, как считается, блокирует апоптоз данных клеток и таким образом противодействует механизмам, которые предотвращают аномальный рост раковых и опухолевых клеток. С другой стороны, нормальные  
25 клетки экспрессируют совсем небольшое количество сурвивина. Поэтому сурвивин представляет собой идеальный опухолеспецифический антиген или антиген, которым обогащены опухоли. Поэтому задача настоящего изобретения состоит в том, чтобы доставить антигенную форму белка сурвивина антиген-  
30 презентующим клеткам, с тем чтобы мог быть стимулирован иммунный ответ на сурвивин-экспрессирующие опухолевые клетки. Белки и гены сурвивина человека и млекопитающих детально описаны в патенте США US 6245523 или WO 2004/067023.

### *Сурвивин немлекопитающих*

35 В центре одного аспекта изобретения находится неожиданно обнаруженный факт, состоящий в том, что гены и/или белки сурвивина немлекопитающих могут  
40 быть использованы в вакцинах против рака и других заболеваний. Например, иммунизация мыши или человека нуклеиновой кислотой, кодирующей куриный сурвивин, может вызывать образование CD8<sup>+</sup> Т-клеток, которые будут атаковать  
45 клетки, экспрессирующие сурвивин мыши или человека, соответственно. Данное открытие показывает, что белок куриного сурвивина является иммунологически по существу аналогичным сурвивину человека, это дает возможность предположить, что куриный сурвивин может быть использован в качестве антигенной формы  
50 белка сурвивина, для того чтобы вызывать иммунный ответ у млекопитающего.

Выравнивание белков сурвивина из различных видов млекопитающих и немлекопитающих представлено на Фигуре 1. Белки сурвивина, включенные в выравнивание, представляют собой сурвивин человека (Genbank регистрационный номер NM\_001168 или O15392, SEQ ID NO: 8), сурвивин собаки (Genbank регистрационный номер NP\_001003019, SEQ ID NO: 9), сурвивин свиньи (Genbank регистрационный номер NP\_999306, SEQ ID NO: 39), коровий сурвивин (Genbank регистрационный номер NP\_001001855, SEQ ID NO: 40), кошачий сурвивин (Genbank регистрационный номер NP\_001009280, SEQ ID NO: 41), сурвивин мыши (Genbank регистрационный номер NP\_033819, SEQ ID NO: 10), сурвивин крысы (Genbank регистрационный номер AAF82586, SEQ ID NO: 42), сурвивин орангутана (Genbank регистрационный номер CAH91231, SEQ ID NO: 43), куриный сурвивин (Genbank регистрационный номер NP\_001012318, SEQ ID NO: 11, "дикий тип"), SIX сурвивин *Xenopus laevis* (Genbank регистрационный номер AAO20085, SEQ ID NO: 13), гомолог сурвивина *Xenopus laevis* (Genbank регистрационный номер AAM76714, SEQ ID NO: 46), гомолог 2 сурвивина *Xenopus laevis* (Genbank регистрационный номер AAH89271, SEQ ID NO: 47), гомолог сурвивина из сома (Genbank регистрационный номер CK419466, SEQ ID NO: 52), гомолог сурвивина из полосатого данио (Genbank регистрационный номер NP\_919378, SEQ ID NO: 48), гомолог 2 сурвивина из полосатого данио (Genbank регистрационный номер NP\_660196, SEQ ID NO: 49), сурвивин-подобный гомолог рыбы-собаки (Genbank регистрационный номер CAG04432, SEQ ID NO: 50) и сурвивин-подобный гомолог 2 рыбы-собаки (Genbank регистрационный номер CAG07433, SEQ ID NO: 51). Все последовательности, раскрытые в данном описании путем указания их регистрационных номеров в Genbank, включены посредством ссылки. Последовательности, включенные в Фигуру 1, также приведены в перечне последовательностей описания изобретения.

Кроме того, в прилагаемый перечень последовательностей также включены два варианта куриного сурвивина, вариант 1 (Genbank регистрационный номер NM\_001012319, SEQ ID NO: 44), который начиная с аминокислотного остатка 116 отличается от последовательности куриного сурвивина дикого типа, соответствующей SEQ ID NO: 11, что приводит к получению другого С-конца, и вариант 2 (Genbank регистрационный номер NP\_001012317, SEQ ID NO: 45), который начиная с аминокислотного остатка 38 отличается от последовательности куриного сурвивина дикого типа, соответствующей SEQ ID NO: 11.

В перечень последовательностей включены следующие дополнительные последовательности: последовательность сурвивина человека (Genbank

регистрационный номер NM\_001168.2, SEQ ID NO: 64); сурвивина *Homo sapiens* (Genbank регистрационный номер O15392, SEQ ID NO: 65); сурвивина *Canis familiaris* (Genbank регистрационный номер NM\_001003019.1, SEQ ID NO: 66);  
5 сурвивина *Sus scrofa* (Genbank регистрационный номер NP\_999306.1, SEQ ID NO: 67); сурвивина *Bos taurus* (Genbank регистрационный номер NP\_001001855.2, SEQ ID NO: 68); сурвивина *Felis catus* (Genbank регистрационный номер NP\_001009280.1, SEQ ID NO: 69); сурвивина *Mus musculus* (Genbank регистрационный номер NP\_033819.1, SEQ ID NO: 70); сурвивина *Rattus norvegicus* (Genbank регистрационный номер AAF82586.1, SEQ ID NO: 71); сурвивина *Pongo pygmaeus* (Genbank регистрационный номер CAH91231.1, SEQ ID NO: 72);  
10 сурвивина *Gallus gallus* (Genbank регистрационный номер NP\_001012318.1, SEQ ID NO: 73); SIX сурвивина *Xenopus laevis* (Genbank регистрационный номер AAO20085.1, SEQ ID NO: 74); гомолога сурвивина *Xenopus laevis* (Genbank регистрационный номер AAM76714.1, SEQ ID NO: 75); гомолога 2 сурвивина *Xenopus laevis* (Genbank регистрационный номер AAH89271.1, SEQ ID NO: 76); нуклеиновой кислоты, кодирующей сурвивин *Ictalurus punctatus* (Genbank регистрационный номер CK419466.1, SEQ ID NO: 77); гомолога сурвивина *Danio rerio* (Genbank регистрационный номер NP\_919378.1, SEQ ID NO: 78); гомолога 2 сурвивина *Danio rerio* (Genbank регистрационный номер NP\_660196.1, SEQ ID NO: 79); сурвивин-подобного гомолога *Tetraodon nigroviridis* (Genbank регистрационный номер CAG04432.1, SEQ ID NO: 80); сурвивин-подобного гомолога 2 *Tetraodon nigroviridis* (Genbank регистрационный номер CAG07433.1, SEQ ID NO: 81); сурвивина *Drosophila melanogaster* (Genbank регистрационный номер AAF55399.1, SEQ ID NO: 82) и сурвивина *Caenorhabditis elegans* (Genbank регистрационный номер NP\_505949.1, SEQ ID NO: 83).  
35

Изобретение предполагает использование не только последовательностей сурвивина, которые найдены в природе, таких как последовательности сурвивина, раскрытые на Фиг. 1, но также других аминокислотных последовательностей,  
40 которые имеют, например, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% аминокислотную идентичность по меньшей мере одной из последовательностей, раскрытых на Фиг. 1.  
45

Как показано на Фигуре 1, тогда как белки сурвивина млекопитающих в выравнивании идентичны сурвивину человека более чем на 80%, гомологи сурвивина из немлекопитающих в выравнивании идентичны сурвивину человека менее чем на 60%. Однако внутри BIR-домена (подчеркнутая область в  
50

выравнивании на Фигуре 1) белки сурвивина немлекопитающих идентичны сурвивину человека более чем на 60%, но менее чем на 80%, тогда как белки сурвивина млекопитающих идентичны сурвивину человека более чем на 90%. Уровни попарной идентичности последовательностей BIR-доменов гомологов сурвивина, выраженные в процентах, суммированы на Фигуре 2. Например, куриный сурвивин в пределах BIR-домена идентичен сурвивину человека приблизительно на 78%.

Существенно, что, как видно из Фигуры 1, в курином сурвивине внутри BIR-домена существует только один 9-мерный пептид (18-26: STRAATFRN) (SEQ ID NO: 7), имеющий более чем 50% отклонение аминокислотной последовательности от соответствующей последовательности человека (5 из 9 аминокислот являются другими в данном конкретном 9-мерном пептиде). Большинство 9-мерных пептидов внутри BIR-домена куриного сурвивина содержат два или менее изменения в последовательности (48 из 64 пептидов). Безотносительно к какой-либо теории предполагают, что такая степень консервативности последовательностей является эффективной для того, чтобы куриный сурвивин был иммунологически по существу аналогичным сурвивину человека.

В общем случае, процент идентичности BIR-домена куриного сурвивина BIR-доменам сурвивина млекопитающих (данные приведены на Фигуре 2) варьирует от приблизительно 72% до приблизительно 78%. Кроме того, приблизительно 75% 9-мерных пептидов BIR-домена, происходящих от куриного сурвивина, содержат два или менее изменения в последовательности по сравнению с соответствующими 9-мерными пептидами млекопитающих. Например, куриный сурвивин идентичен на 75% процентов сурвивину мыши в пределах BIR-домена, что согласуется с данными о том, что куриный сурвивин является иммунологически по существу аналогичным сурвивину мыши, как описано в Примере 6 ниже.

Эффективность композиции сурвивина немлекопитающих, такой как композиция куриного сурвивина, в индукции у мыши иммунного ответа, направленного против опухоли, экспрессирующей сурвивин мыши, проиллюстрированная в нижеприведенных Примерах, подчеркивает принцип изобретения, а именно, вакцинация млекопитающих молекулой сурвивина немлекопитающих является полезной для индукции иммунного ответа против сурвивина млекопитающих или против клеток, сверхэкспрессирующих сурвивин млекопитающих. Соответственно, куриный сурвивин является также полезным для индукции эффективного иммунного ответа у людей против клеток, которые сверхэкспрессируют сурвивин человека, таких как многие опухолевые клетки, так

как иммунологический ответ у млекопитающих является достаточно консервативным.

5 В отличие от этого, выравнивание BIR-доменов беспозвоночных против BIR-  
домена сурвивина человека показывает, что BIR-домены *D. melanogaster*  
(AAF55399, SEQ ID NO: 53) и *C. elegans* (NP\_505949, SEQ ID NO: 54) идентичны  
10 последовательности BIR-домена сурвивина человека на 50% или менее (Фигура 3),  
хотя остатки, важные для хелатирования Zn, являются консервативными (смотри  
звездочки в выравнивании на Фигуре 3). Например, BIR-домен сурвивина мухи  
идентичен BIR-домену сурвивина человека приблизительно на 50%. Существенно,  
15 что BIR-домен мухи содержит только три (3 из 64) 9-мерных пептида, которые  
имеют две или менее аминокислотные замены по сравнению с соответствующим  
пептидом человека.

Согласно изобретению термин "сурвивин немлекопитающих" в контексте  
данного описания включает по меньшей мере любой белок сурвивин, имеющий  
20 BIR-домен (или IAP-домен), показывающий по меньшей мере более чем 50%  
аминокислотную идентичность, но менее чем 90% аминокислотную идентичность  
BIR-домену сурвивина человека, например по меньшей мере 55%, 60%, 65%, 70%,  
25 75%, 80% или 85% идентичность BIR-домену сурвивина человека.

Чтобы вычислить процент идентичности, последовательно сравнивают  
выровненные аминокислоты каждой последовательности. Если аминокислоты  
являются неидентичными, оценка парной идентичности равна нулю; в противном  
30 случае оценка парной идентичности равна 1,0. Первичная оценка идентичности  
представляет собой сумму идентичных аминокислот в выравнивании. Затем  
первичную оценку нормализуют путем ее деления на количество аминокислот в  
наиболее короткой из исследуемой и контрольной последовательностей и  
35 умножения результата на 100. Нормализованная первичная оценка представляет  
собой процент идентичности. При вычислении процента идентичности вставки и  
делеции игнорируются. Соответственно, штрафы за гэпы в данном вычислении не  
используют.  
40

Методики получения множественных выравниваний последовательностей  
хорошо известны специалистам в данной области техники. Для выравнивания  
45 последовательностей сурвивина использовали модуль Megalign 6.1 пакета  
программ DNASTAR Lasergene™ 6, используя алгоритм выравнивания ClustalV и  
параметры по умолчанию (Higgins and Sharp (1989) Comput Appl Biosci. 5:151-3).  
Для субвыравнивания BIR-доменов сурвивина использовали методику ClustalW  
50

("slow-accurate") и параметры по умолчанию (Thompson *et al.* (1994) *Nucleic Acids Res.* 22:4673-80).

Предполагают, что сурвивин немлекопитающих также может содержать больше пептидов, которые могут вызывать ответ, опосредованный хелперными Т-клетками, чем сурвивин млекопитающих. Безотносительно к какой-либо теории предполагают, что более сильный эффект иммунизации может быть достигнут в том случае, когда при иммунном ответе происходит встреча как с цитотоксическими Т-клетками, через МНС I, так и с хелперными Т-клетками, через МНС II. Отличия в последовательностях эндогенного сурвивина человека и сурвивина немлекопитающих, по-видимому, дают для презентации некоторые пептиды, к которым иммунная система человека не толерантна. Наличие потенциальных МНС II-эпитопов может быть проанализировано с использованием алгоритмов предсказания, открытых для общего доступа, таких как ProPred Analysis ([www.imtech.res.vt.edu/raghava/propred](http://www.imtech.res.vt.edu/raghava/propred); Singh *et al.*, (2001) *Bioinformatics* 17:1236-1237, содержание которых сюда включено посредством ссылки). При использовании такого алгоритма обнаружено, что по сравнению с белками сурвивина млекопитающих, такими как сурвивин человека или собаки, белки сурвивина немлекопитающих, такие как куриный сурвивин или SIX сурвивин лягушки, согласно предсказанию содержат больше пептидов, которые связываются с молекулами МНС II и/или пептидов, обладающих более высокой аффинностью связывания с этими молекулами (смотри Таблицу 1).

Таблица 1. Предсказание связывания пептидов с HLA-DR человека

#	Пептид	#связь	оценка	
Сурвивин человека (SEQ ID NO: 8)				
10	WQPFLKDHR	2	59,1	(остатки 10-18 SEQ ID NO: 8)
13	FLKDHRIST	9	272,5	(остатки 13-21 SEQ ID NO: 8)
14	LKDHRISTF	3	68,2	(остатки 14-22 SEQ ID NO: 8)
19	ISTFKNWPFF	3	81,6	(остатки 19-27 SEQ ID NO: 8)
22	FKNWPFFLEG	4	95,9	(остатки 22-30 SEQ ID NO: 8)
28	LEGCACTPE	1	21,3	(остатки 28-36 SEQ ID NO: 8)
43	FINCPTENE	4	114,6	(остатки 43-51 SEQ ID NO: 8)
58	FFCFKELEG	3	80,6	(остатки 58-66 SEQ ID NO: 8)
74	IEEHKKHSS	11	320,3	(остатки 74-82 SEQ ID NO: 8)
86	FLSVKKQFE	5	142,5	(остатки 86-94 SEQ ID NO: 8)
87	LSVKKQFEE	3	79,9	(остатки 87-95 SEQ ID NO: 8)

	Сурвивин человека (SEQ ID NO: 8)			
	96	LTLGEFLKL	5 148,5	(остатки 96-104 SEQ ID NO: 8)
	98	LGEFLKLDLDR	7 171,3	(остатки 98-106 SEQ ID NO: 8)
5	101	FLKLDLDRERA	5 106,3	(остатки 101-109 SEQ ID NO: 8)
	102	LKLDLDRERAK	1 20,0	(остатки 102-110 SEQ ID NO: 8)
	113	IAKETNNKK	2 48,8	(остатки 113-121 SEQ ID NO: 8)
10	#	Пептид	#связь	оценка
	Сурвивин собаки (SEQ ID NO: 9)			
	10	WQPFLLKDHHR	2 59,1	(остатки 10-18 SEQ ID NO: 9)
	13	FLKDHHRIST	9 272,5	(остатки 13-21 SEQ ID NO: 9)
15	14	LKDHHRISTF	3 68,2	(остатки 14-22 SEQ ID NO: 9)
	19	ISTFKNWPF	3 81,6	(остатки 19-27 SEQ ID NO: 9)
	22	FKNWPFLEG	4 95,9	(остатки 22-30 SEQ ID NO: 9)
	43	FIHCPTENE	4 114,6	(остатки 43-51 SEQ ID NO: 9)
20	58	FFCFKELEG	3 80,6	(остатки 58-66 SEQ ID NO: 9)
	74	IEENKKHSS	11 320,3	(остатки 74-82 SEQ ID NO: 9)
	86	FLSVKKQFE	5 142,5	(остатки 86-94 SEQ ID NO: 9)
	87	LSVKKQFEE	3 79,9	(остатки 87-95 SEQ ID NO: 9)
25	96	LTLGEFLKL	5 148,5	(остатки 96-104 SEQ ID NO: 9)
	98	LGEFLKLDLDR	7 171,3	(остатки 98-106 SEQ ID NO: 9)
	101	FLKLDLDRERA	5 106,3	(остатки 101-109 SEQ ID NO: 9)
	102	LKLDLDRERAK	1 20,0	(остатки 102-110 SEQ ID NO: 9)
30	113	IAKETNNKK	2 48,8	(остатки 113-121 SEQ ID NO: 9)
	#	Пептид	#связь	оценка
	Сурвивин мыши (SEQ ID NO: 10)			
35	6	LPQIWQLYL	2 70,7	(остатки 6-14 SEQ ID NO: 10)
	10	WQLYLKNYR	26 897,3	(остатки 10-18 SEQ ID NO: 10)
	12	LYLKNYRIA	10 278,3	(остатки 12-20 SEQ ID NO: 10)
	13	YLKNYRIAT	8 202,3	(остатки 13-21 SEQ ID NO: 10)
40	14	LKNYRIATF	19 627,3	(остатки 14-22 SEQ ID NO: 10)
	17	YRIATFKNW	5 139,8	(остатки 17-25 SEQ ID NO: 10)
	19	IATFKNWPF	4 111,6	(остатки 19-27 SEQ ID NO: 10)
	22	FKNWPFLED	2 55,9	(остатки 22-30 SEQ ID NO: 10)
45	43	FIHCPTENE	4 114,6	(остатки 43-51 SEQ ID NO: 10)
	58	FFCFKELEG	3 80,6	(остатки 58-66 SEQ ID NO: 10)
	67	WEPDDNPIE	1 26,3	(остатки 67-75 SEQ ID NO: 10)
50	86	FLTVKKQME	3 91,7	(остатки 86-94 SEQ ID NO: 10)

5	Сурвивин мыши (SEQ ID NO: 10)				
	87	LTVKKQMEE	4	135,9	(остатки 87-95 SEQ ID NO: 10)
	96	LTVSEFLKL	4	146,9	(остатки 96-104 SEQ ID NO: 10)
	101	FLKLDQRQA	13	305,6	(остатки 101-109 SEQ ID NO: 10)
	102	LKLDQRQAK	8	223,6	(остатки 102-110 SEQ ID NO: 10)
	113	IAKETNNKQ	3	90,8	(остатки 113-121 SEQ ID NO: 10)
10	#	Пептид	#связь	оценка	
	куриный сурвивин (SEQ ID NO: 11)				
	1	MAAYAEMLP	2	42,9	(остатки 1-9 SEQ ID NO: 11)
	7	MLPKEWLVI	2	51,0	(остатки 7-15 SEQ ID NO: 11)
15	12	WLVYLVSTR	11	315,7	(остатки 12-20 SEQ ID NO: 11)
	13	LVYLVSTRA	34	1188,0	(остатки 13-21 SEQ ID NO: 11)
	14	VYLVSTRAA	28	842,9	(остатки 14-22 SEQ ID NO: 11)
	15	YLVSTRAAT	3	70,8	(остатки 15-23 SEQ ID NO: 11)
20	16	LVSTRAATF	8	234,7	(остатки 16-24 SEQ ID NO: 11)
	24	FRNWPFTTEG	2	46,4	(остатки 24-32 SEQ ID NO: 11)
	45	FVHCPSSENS	23	656,0	(остатки 45-53 SEQ ID NO: 11)
	56	VVQCFCLCK	2	42,9	(остатки 56-64 SEQ ID NO: 11)
25	57	VQCFCLKE	14	428,5	(остатки 57-65 SEQ ID NO: 11)
	60	FFCLKELEG	3	81,0	(остатки 60-68 SEQ ID NO: 11)
	61	FCLKELEGW	2	41,5	(остатки 61-69 SEQ ID NO: 11)
	76	LEEHKKHSA	7	161,8	(остатки 76-84 SEQ ID NO: 11)
30	91	LQKDPNLT	8	226,6	(остатки 91-99 SEQ ID NO: 11)
	98	LTVQEFKLK	2	48,3	(остатки 98-106 SEQ ID NO: 11)
	100	VQEFKLKLDK	14	377,6	(остатки 100-108 SEQ ID NO: 11)
	103	FLKLDKKRT	9	236,2	(остатки 103-111 SEQ ID NO: 11)
35	104	LKLDKKRTK	19	686,1	(остатки 104-112 SEQ ID NO: 11)
	114	VIKKAISQK	3	90,1	(остатки 114-122 SEQ ID NO: 11)
	115	IKKAISQKE	3	78,6	(остатки 115-123 SEQ ID NO: 11)
40	129	VAKGVRHAI	2	46,9	(остатки 129-137 SEQ ID NO: 11)
	#	Пептид	#связь	оценка	
	ChickenSurvivin(N97E,T99M,V100L,Q101G) (SEQ ID NO: 12)				
45	1	MAAYAEMLP	2	42,9	(остатки 1-9 SEQ ID NO: 12)
	7	MLPKEWLVI	2	51,0	(остатки 7-15 SEQ ID NO: 12)
	12	WLVYLVSTR	11	315,7	(остатки 12-20 SEQ ID NO: 12)
50					

#	Пептид	#связь	оценка	
ChickenSurvivin(N97E, T99M, V100L, Q101G) (SEQ ID NO: 12)				
5	13 LVYLVSTRA	34	1188,0	(остатки 13-21 SEQ ID NO: 12)
	14 VYLVSTRAA	28	842,9	(остатки 14-22 SEQ ID NO: 12)
	15 YLVSTRAAT	3	70,8	(остатки 15-23 SEQ ID NO: 12)
	16 LVSTRAATF	8	234,7	(остатки 16-24 SEQ ID NO: 12)
10	24 FRNWPFTG	2	46,4	(остатки 24-32 SEQ ID NO: 12)
	45 FVHCPSENS	23	656,0	(остатки 45-53 SEQ ID NO: 12)
	56 VVQCFCLK	2	42,9	(остатки 56-64 SEQ ID NO: 12)
	57 VQCFCLK	14	428,5	(остатки 57-65 SEQ ID NO: 12)
	60 FFCLKELEG	3	81,0	(остатки 60-68 SEQ ID NO: 12)
15	61 FCLKELEGW	2	41,5	(остатки 61-69 SEQ ID NO: 12)
	76 LEEHKKHSA	7	161,8	(остатки 76-84 SEQ ID NO: 12)
	91 LQKDPSELM	9	312,0	(остатки 91-99 SEQ ID NO: 12)
	98 LMLGEFLKL	5	201,1	(остатки 98-106 SEQ ID NO: 12)
20	100 LGEFLKLDK	3	79,5	(остатки 100-108 SEQ ID NO: 12)
	103 FLKLDKKRT	9	236,2	(остатки 103-101 SEQ ID NO: 12)
	104 LKLDKKRTK	19	686,1	(остатки 104-112 SEQ ID NO: 12)
	114 VIKKAISQK	3	90,1	(остатки 114-122 SEQ ID NO: 12)
25	115 IKKAISQKE	3	78,6	(остатки 115-123 SEQ ID NO: 12)
	129 VAKGVRHAI	2	46,9	(остатки 129-137 SEQ ID NO: 12)
30	SIX сурвивин лягушки (SEQ ID NO: 13)			
	1 MLSISPIVS	35	1104,7	(остатки 1-9 SEQ ID NO: 13)
	2 LSISPIVSL	3	135,9	(остатки 2-10 SEQ ID NO: 13)
	4 ISPIVSLRR	6	143,4	(остатки 4-12 SEQ ID NO: 13)
35	7 IVSLRRCN	30	926,8	(остатки 7-15 SEQ ID NO: 13)
	8 VSLRRCN	1	22,1	(остатки 8-16 SEQ ID NO: 13)
	10 LRRCDNEPS	27	867,5	(остатки 10-18 SEQ ID NO: 13)
	23 WRLYNLATR	28	1040,3	(остатки 23-31 SEQ ID NO: 13)
40	25 LYNLATRLR	22	716,5	(остатки 25-33 SEQ ID NO: 13)
	26 YNLATRLRT	21	663,2	(остатки 26-34 SEQ ID NO: 13)
	28 LATRLRTFS	2	59,1	(остатки 28-36 SEQ ID NO: 13)
	32 LRTFSNWP	20	710,0	(остатки 32-40 SEQ ID NO: 13)
45	56 FVHCPTDNS	21	683,3	(остатки 56-64 SEQ ID NO: 13)
	67 VVKCFCLK	2	42,9	(остатки 67-75 SEQ ID NO: 13)
50	68 VKCFCLK	12	374,2	(остатки 68-76 SEQ ID NO: 13)

SIX сурвивин лягушки (SEQ ID NO: 13)				
71	FFCLKELEG	3	81,0	(остатки 71-79 SEQ ID NO: 13)
72	FCLKELEGW	2	41,5	(остатки 72-80 SEQ ID NO: 13)
98	LFIALKKKA	30	1015,6	(остатки 98-106 SEQ ID NO: 13)
99	FIALKKKAE	9	325,6	(остатки 99-107 SEQ ID NO: 13)
100	IALKKKAEE	13	464,8	(остатки 100-108 SEQ ID NO: 13)
109	LTLSEFLKL	4	165,8	(остатки 109-117 SEQ ID NO: 13)
111	LSEFLKLDL	3	81,6	(остатки 111-119 SEQ ID NO: 13)
115	LKLDLENTK	6	164,7	(остатки 115-123 SEQ ID NO: 13)
124	IKMQQMNLI	28	729,2	(остатки 124-132 SEQ ID NO: 13)
126	MQQMNLIHI	14	419,4	(остатки 126-134 SEQ ID NO: 13)
130	MNLHIERFQ	12	410,6	(остатки 130-138 SEQ ID NO: 13)
134	IERFQAKAN	1	24,4	(остатки 134-142 SEQ ID NO: 13)
144	VRGHLEKLD	4	103,7	(остатки 144-152 SEQ ID NO: 13)

В Таблице 1 приведена начальная позиция (#) и последовательность (Пептид) каждого 9-мерного пептида, который связывается по меньшей мере с одной аллелью HLA-DR. Обозначение #связь относится к количеству аллелей (из 50), с которыми связываются данные пептиды, и прочность связывания с которыми выше произвольно выбранного порогового значения для связывания, в данном случае 20%. Пороговое значение 20% относится к 20% от теоретической максимальной оценки связывания, рассчитанной с помощью алгоритма, реализованного в Propred. Оценка относится к совокупной оценке для всех HLA-аллелей, с которыми связывается данный пептид. Для примера, пептид VVHFFKNIV (SEQ ID NO: 14) основного миелинового белка человека (MBP), происходящий от фрагмента белка, в ответ на который, как известно, у людей вырабатываются антитела к MBP (MBP(85-99)), связывается с 29 HLA-аллелями с совокупной оценкой 1087,6.

Желательно получить вакцину, содержащую или кодирующую пептид, происходящий от сурвивина немлекопитающих, которая способна активировать Т-клетки, распознающие последовательность пептида сурвивина человека в комплексе с молекулой МНС. Такие пептиды сурвивина человека или пептиды, полученные из них, включают EPDLAQCFE (SEQ ID NO: 3), EPDLAQCFY (SEQ ID NO: 15), CPTENEPDL (SEQ ID NO: 2) и CPTENEPDY (SEQ ID NO: 16), но не ограничены ими. Дополнительные пептиды человека и модификации, полезные для активации Т-клеток или повышающие активацию Т-клеток, описаны в

публикации заявки на патент США US 2004-0210035, содержание которой настоящим включено посредством ссылки.

Соответственно, может оказаться полезным введение в последовательность сурвивина немлекопитающих мутаций, которые соответствуют известным эпитопам сурвивина человека, или которые могут повысить связывание этих пептидных последовательностей с МНС. Например, может оказаться полезным введение аминокислотных замен в последовательность куриного сурвивина в позициях Asn97, Thr99, Val100 или Gln101. Безотносительно к какой-либо теории, замена в позиции Thr99 в курином сурвивине может повысить связывание полученного пептида с молекулами МНС. В качестве конкретного примера, пептид, происходящий от куриного сурвивина, может содержать по меньшей мере одну из следующих аминокислотных замен: Asn97Glu, Thr99Met, Val100Leu и Gln101Gly. В качестве другого примера, может оказаться полезным введение в SIX сурвивин лягушки аминокислотных замен в позициях Thr110 или Ser112. Аминокислотная последовательность SIX сурвивина *Xenopus* (T110M, S112G) соответствует SEQ ID NO:55. Безотносительно к какой-либо теории, замена в позиции Thr110 может повысить связывание полученного пептида с молекулой МНС. В качестве конкретного примера, пептид, происходящий от сурвивина лягушки, может содержать по меньшей мере одну из следующих замен: Thr110Met, Ser112Gly.

Пептид сурвивина немлекопитающих, подходящий для изобретения, также может содержать аминокислотные делеции. Например, пептид сурвивина немлекопитающих может содержать обрыв С-конца или обрыв N-конца.

Возможно, что некоторые слабо консервативные участки последовательности в белке сурвивина немлекопитающих могли бы быть общими с последовательностями других, не являющимися сурвивином, белков человека, которые могут не иметь такого же профиля экспрессии, как сурвивин человека, и, соответственно, могут не являться опухолеспецифическими. На начальном этапе это можно оценить, выполняя с помощью программы BLAST (basic local alignment search tool) поиск с использованием последовательности из дивергентной области сурвивина немлекопитающих против неизбыточной (non-redundant) базы данных по белкам человека, с параметрами, которые идентифицируют короткие, почти точные совпадения. Например, поиск с использованием С-концевого домена последовательности куриного сурвивина (aa90-aa142) идентифицирует только несколько белков человека с почти точными совпадениями (менее пяти результатов поиска). Затем данные белки человека могут быть дополнительно проанализированы в отношении их паттернов экспрессии и в отношении их

возможности образовывать антигенный пептид, сначала с помощью описанных ниже методик *in silico*.

5                    *Модифицированный сурвивин*

В другом аспекте в изобретении предложены антигенные формы белка сурвивина, полученные путем введения модификаций в белки сурвивина млекопитающих. Конкретно, изобретение предполагает применение пептидов модифицированного сурвивина млекопитающих, которые являются биологически инертными, но иммунологически по существу аналогичными сурвивину млекопитающих. Данный аспект изобретения также направлен на решение двух конкретных проблем, связанных с подходом, предполагающим прямую экспрессию белка сурвивина в цитоплазме антигена-презентирующей клетки. Первая проблема состоит в том, что биологически активный белок сурвивин может нарушать физиологию антиген-презентирующей клетки. Вторая проблема состоит в том, что, когда сурвивин, или по существу любой другой белок, экспрессируется в клетке, только небольшая фракция этого белка подвергается такой деградации, что антигенные пептиды могут быть презентированы на клеточной поверхности молекулами МНС класса I.

Соответственно, изобретение предполагает применение белков модифицированного сурвивина млекопитающих, включая мутантные варианты сурвивина человека или мутантные варианты сурвивина млекопитающих, не относящегося к человеку. Изобретение также предполагает применение не только последовательностей сурвивина, которые найдены в природе, таких как последовательности сурвивина, раскрытые на Фиг. 1, но также других аминокислотных последовательностей, которые имеют, например, по меньшей мере 70% , по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% аминокислотную идентичность по меньшей мере одной из последовательностей, раскрытых на Фиг. 1.

Структура сурвивина человека уже определена (Chantalat *et al.*, (2000) Mol. Cell 6:183-189; архив белковых структур Protein Data Bank (PDB), регистрационный номер: PDB ID 1E31; Verdecia *et al.*, (2000) Nat. Struct. Bio. 7:602-608; архив белковых структур Protein Data Bank (PDB), регистрационный номер: PDB ID 1F3H, идеи каждой из данных работ включены настоящим посредством ссылки). Согласно 3-D (трехмерной) структуре сурвивин человека содержит по меньшей мере два домена: N-концевой глобулярный домен, который включает сайт связывания с цинком, называемый BIR- или IAP-доменом, и протяженную C-

концевую альфа-спираль, называемую в данном описании спиральным доменом. В предпочтительном воплощении в изобретении предложены формы сурвивина с мутацией в N-концевом BIR-домене и/или в C-концевом спиральном домене. Согласно изобретению, оптимальный эффект может быть достигнут путем мутирования обоих доменов. Безотносительно к какой-либо теории считают, что как N-концевой BIR-домен, так и C-концевой спиральный домен обладают биологической активностью. Например, BIR-домен проявляет некоторую антиапоптотическую активность даже в отсутствии спирального домена. Кроме того, спиральный домен проявляет активность связывания с цитоскелетом, и, возможно, имеет другую биологическую активность.

Конкретно, в BIR-домене, например, предпочтительные мутации включают аминокислотные замены в позициях, соответствующих Cys57, Cys60, His77 или Cys84 сурвивина человека, но не ограничены ими. Например, модифицированный BIR-домен может содержать по меньшей мере одну из следующих замен: Cys57Ser, Cys60Ser, His77Phe и Cys84Ser. Замены любой из этих аминокислот на аланин или пролин также являются предпочтительными. Считается, что данные мутации нарушают сайт связывания с цинком в BIR-домене. Также могут быть использованы другие мутации, которые приводят к нарушению сайта связывания с цинком. Кроме того, для получения неактивного BIR-домена могут быть использованы мутации в позиции, соответствующей Arg18 сурвивина человека, предпочтительно замены на аспарагиновую кислоту или глутаминовую кислоту. Особенно предпочтительными являются модифицированные BIR-домены, у которых аминокислоты, участвующие в связывании цинка, мутированы в двух, трех или четырех позициях.

Обычно для нарушения функции спирального домена является полезным введение остатков пролина в любую позицию в этом домене. В частности, пролиновые замены могут быть введены в позициях, соответствующих Ala128 или Ile135 сурвивина человека. Другие аминокислотные замены, которые могут нарушить спиральный домен, также являются предпочтительными.

Предпочтительный модифицированный сурвивин млекопитающих может содержать мутации в позициях Arg18, Cys57, Cys60, His77 и/или Cys84 и пролин в спиральном домене. Каждая из вышеупомянутых аминокислот в позициях Arg18, Cys57, Cys60, His77, Cys84, Ala128 и Ile135 является консервативной у сурвивина человека и куриного сурвивина, и, соответственно, для получения биологически инертного куриного сурвивина могут быть введены те же самые мутации.

Аналогичные мутации могут быть введены также в соответствующие позиции других белков сурвивина немлекопитающих.

Любая из вышеупомянутых мутаций может быть комбинирована с мутацией в позиции, соответствующей Leu98 сурвивина человека, такой как, например, Leu98Arg, Leu98Lys и Leu98Ala. В курином сурвивине в позиции, соответствующей Leu98 сурвивина человека, находится Val100.

Другие полезные мутации могут быть идентифицированы путем выполнения стандартных экспериментов, как описано в Примерах. Например, в белок сурвивин вводят мутацию, и тестируют, например, потерю биологической активности, и/или повышенную деградацию, и/или способность вызывать иммунный ответ, направленный против опухолевых клеток. Типичные методики анализа для данных тестов описаны ниже в примерах и являются известными в данной области техники.

Обычно пептид предпочтительного модифицированного сурвивина содержит три, четыре, пять или более мутаций. Однако изобретение предполагает в качестве одного из применений модифицированного сурвивина его применение для презентации происходящих от сурвивина пептидов, содержащих Т-клеточные эпитопы, молекулами МНС класса I. Соответственно, обычно предпочтительно мутировать менее пятидесяти (или менее тридцати, или менее двадцати) аминокислот, чтобы сохранить иммунологически существенное сходство с сурвивином млекопитающих.

#### *Презентация антигена*

В изобретении предложены основные принципы оптимального введения мутаций в сурвивин или другие белковые последовательности, для того чтобы процессинг эпитопов МНС класса I проходил относительно беспрепятственно.

Возможно, что некоторые мутации сурвивина могут лежать внутри пептидного сегмента, который презентует молекула МНС класса I и распознает конкретный Т-клеточный рецептор. Также возможно, что мутация может изменять протеолитический процессинг сурвивина с образованием пептидных эпитопов таким образом, что либо эпитоп расщепляется, либо эпитоп не расщепляется, но предпочтительно возникает новый эпитоп.

Обращаясь к вопросу презентации антигена, следует отметить, что можно использовать базы данных и информацию, находящиеся в открытом доступе, чтобы идентифицировать в белке сурвивине возможные эпитопы МНС класса I и затем определить, изменяет ли мутация эпитоп. Например, может быть

использован алгоритм SYFPEITHI ([www.uni-tuebingen.de/uni.kxi](http://www.uni-tuebingen.de/uni/kxi); также смотри, Rammensee *et al.*, (1999) *Immunogenetics* 50:213-219, идеи которых настоящим включены в данное описание посредством ссылки). Альтернативно может быть  
5 использован алгоритм BIMAS ([bimas.dcrt.nih.gov/molbio/hla\\_bind/](http://bimas.dcrt.nih.gov/molbio/hla_bind/); также смотри, Parker *et al.*, (1994) *J. Immunol.* 152:163-175, идеи которых настоящим включены в  
данное описание посредством ссылки). Так как HLA-гены, кодирующие белки МНС  
10 класса I человека, являются высоко полиморфными, при этом разные белки МНС  
класса I связываются с разными пептидными мотивами, создается таблица  
потенциальных эпитопов, где по одной оси расположены различные молекулы  
МНС класса I, а по другой оси - последовательность сурвивина. Записи в данной  
15 таблице идентифицируют позиции эпитопа для данной молекулы МНС класса I.  
Эффект исследуемой мутации оценивают на основе эффекта в отношении  
различных эпитопов. В итоге мутацию или мутации выбирают на основании  
20 требований, предъявляемых к вакцине, принимая во внимание, например,  
аллельную частоту разных HLA-аллелей или группоспецифическую частоту HLA-  
аллелей. Обращаясь к вопросу протеолитического процессинга, следует отметить,  
что согласно изобретению можно использовать базы данных и информацию,  
25 находящиеся в открытом доступе, чтобы идентифицировать возможные сайты  
расщепления протеасомой и затем определить, изменяет ли мутация такой сайт  
расщепления. Например, может быть использована база данных открытого  
доступа NetChop ([www.cbs.dtu.dk/services/NetChop/](http://www.cbs.dtu.dk/services/NetChop/)). Обычно предпочтительно  
30 избегать изменения сайтов расщепления.

В иллюстративных целях в Примере 12 предложен типичный анализ для  
определения полезных замен в белке сурвивине.

35 Согласно изобретению также полезно рассмотреть "иммунопротеасому". В  
антиген-презентирующих клетках протеасома имеет до некоторой степени  
различные композиции белков, и ее протеолитическая специфичность  
определяется главным образом ферментом, который расщепляет С-конец до  
40 гидрофобных остатков. В результате, протеасома создает пептиды, которые могут  
связываться с МНС класса I своим С-концевым гидрофобным якорным остатком.  
Если желательно сохранить специфичность паттернов расщепления  
иммунопротеасомы, предпочтительно избегать мутирования таких гидрофобных  
45 остатков, в особенности лейцина, изолейцина, метионина, тирозина, триптофана и  
фенилаланина. Точно также предпочтительно избегать мутирования других  
остатков до лейцина, изолейцина, метионина, тирозина, триптофана и  
50 фенилаланина. Соответственно, преимущество мутаций в позициях Arg18, Cys57,

Cys60, His77 и Cys84 состоит в том, что они дестабилизируют структуру сурвивина и в то же время не элиминируют сайты расщепления иммунопротеасомы. Кроме того, предпочтительно избегать введения мутаций в аминокислоты 7 – 9, примыкающие непосредственно с N-конца к лейцину, изолейцину, метионину, тирозину, триптофану и фенилаланину в белковой последовательности.

Соответственно, в изобретении предложен общий способ идентификации в белковой последовательности сайтов, предпочтительных для мутирования, с целью создания белка с повышенной иммуногенностью. В соответствии с данным способом сайт белковой последовательности, предпочтительный мутирования, имеет следующие свойства. Во-первых, одна или более чем одна мутация в данном сайте дестабилизирует структуру белка. Во-вторых, данная дестабилизирующая мутация не вводит лейцин, изолейцин, метионин, тирозин, триптофан или фенилаланин. В-третьих, нормальная аминокислота в данной позиции не является лейцином, изолейцином, метионином, тирозином, триптофаном или фенилаланином. Данный способ можно применять к самым разным белкам, которые могут быть использованы в качестве антигенов, таких как, например, опухолеспецифические антигены, вирусные антигены и другие антигены. Кроме сурвивина к числу опухолеспецифических антигенов, к которым можно применять данный способ, относятся молекула адгезии эпителиальных клеток, онкогены, такие как Ras, карциноэмбриональный антиген и другие. К числу вирусных антигенов, к которым можно применять данный способ, относятся р24 ВИЧ, гемагглютинин вируса гриппа и другие вирусные белки.

*Слитые белки, содержащие сурвивин немлекопитающих и/или модифицированный сурвивин*

Для усиления деградации группировки сурвивина и ее процессинга с образованием пептидов, которые могут презентировать молекулы МНС класса I, желательно слить пептиды сурвивина немлекопитающих или мутантного сурвивина, описанные выше, с подходящим вторым белком. Например, убиквитин является особенно предпочтительным партнером для сливания с этой целью. Слитый белок убиквитин-сурвивин может быть сконструирован в одной из следующих конфигураций: N-конец-убиквитин-сурвивин-Сконец или N-конец-сурвивин-убиквитин-Сконец. N-конец-убиквитин-сурвивин-С-конец является предпочтительной ориентацией. Кроме того, желательно мутировать N-концевой метионин сурвивина, предпочтительно до аргинина, аспарагиновой кислоты или глутаминовой кислоты. Также желательно ввести лизин в позицию,

соответствующую Ile19 сурвивина человека или Val21 в слитом белке убиквитин-сурвивин.

5 Также желателно слить сурвивин по настоящему изобретению с Fc-  
группировкой. Предпочтительная Fc-группировка содержит CH2- и CH3-домены  
антитела и возможно содержит шарнирную область. Данная Fc-группировка может  
10 быть слита либо с N-концом, либо с C-концом сурвивина. Белковая  
последовательность зрелого слитого белка Fc человека-ChickenSurvivin  
соответствует SEQ ID NO: 25. Белковая последовательность зрелого слитого белка  
Fc мышцы-ChickenSurvivin соответствует SEQ ID NO: 27.

15 Кроме того, слитый белок, содержащий группировки сурвивина и Fc, может  
дополнительно содержать другие группировки, такие как цитокины, которые  
стимулируют иммунную систему, как описано в PCT публикации WO 01/07081.  
Безотносительно к какой-либо теории, присутствие Fc-группировки может повысить  
20 поглощение сурвивин-содержащих слитых белков антиген-презентирующими  
клетками. Обычно предпочтительно, чтобы Fc-группировка происходила от  
организма, который лечат. Например, для лечения человека предпочтительно  
использовать Fc-группировку человека.

25 Слитые бели Fc-сурвивин или нуклеиновые кислоты, кодирующие эти  
слитые белки, предпочтительно могут содержать секреторную сигнальную  
последовательность. Присутствие сигнальной последовательности способствует  
экспрессии этих слитых белков в клеточных линиях млекопитающих, таких как  
30 клетки NS/O, и может обеспечивать секрецию слитого белка *in vivo*, если пациенту  
вводят соответствующую нуклеиновую кислоту. Последовательности, кодирующие  
слитый белок Fc-сурвивин, предпочтительно начинаются в направлении от 5' к 3' с  
"лидерной последовательности", происходящей, например, от легкой (L) цепи  
35 антитела и слитой в рамке с по меньшей мере частью тяжелой цепи  
иммуноглобулина или ее мутантной формы, предпочтительно из Fc $\gamma$ 1-области  
иммуноглобулинового гена  $\gamma$ 1 человека. Fc $\gamma$ 1-область иммуноглобулинового гена  
Fc $\gamma$ 1 предпочтительно включает по меньшей мере часть шарнирного домена и  
40 CH3-домен, и более предпочтительно включает по меньшей мере шарнирный  
домен, CH2-домен и CH3-домен.

45 Фрагмент ДНК, кодирующий сигнальную последовательность,  
предпочтительно кодирует пептидный сегмент, который направляет секрецию Fc-  
слитого белка и затем отщепляется от остальной части Fc-слитого белка.  
Сигнальная последовательность по изобретению представляет собой  
50 полинуклеотид, который кодирует аминокислотную последовательность, которая

инициирует перенос белка через мембрану эндоплазматического ретикулаума. Сигнальные последовательности, которые являются полезными в изобретении, включают сигнальные последовательности легких цепей антител, например антитела 14.18 (Gillies *et al.* (1989) J. Immunol. Meth., 125:191), сигнальные последовательности тяжелых цепей антител, например сигнальную последовательность тяжелой цепи антитела MOPC141 (Sakano *et al.* (1980) Nature, 286:5774), и любые другие сигнальные последовательности, которые являются известными в данной области техники (смотри, например, Watson (1984) Nucleic Acids Research, 12:5145).

Сигнальные последовательности уже хорошо характеризованы в данной области техники, и, как известно, обычно содержат от 16 до 30 аминокислотных остатков, и могут содержать больше или меньше аминокислотных остатков. Типичный сигнальный пептид состоит из трех областей: основной N-концевой области, центральной гидрофобной области и более полярной C-концевой области. Центральная гидрофобная область содержит от 4 до 12 гидрофобных остатков, которые заякоривают сигнальный пептид в липидном бислое мембраны во время переноса образующегося полипептида. После инициации сигнальный пептид обычно отщепляется в просвете эндоплазматического ретикулаума клеточными ферментами, известными как сигнальные пептидазы. Потенциальный сайт отщепления сигнального пептида обычно следует "правилу (-3, -1)". Соответственно, у типичного сигнального пептида в позициях -1 и -3 находятся небольшие нейтральные аминокислотные остатки и в данной области отсутствует остаток пролина. Сигнальная пептидаза обычно отщепляет такой сигнальный пептид между аминокислотами -1 и +1. Соответственно, сигнальная последовательность может отщепляться от N-конца слитого белка во время секреции. Это приводит к секреции Fc-слитого белка. Последовательности сигнальных пептидов, полезные в практическом осуществлении изобретения, хорошо известны в данной области техники. Смотри, например, von Heijne (1986) Nucleic Acids Res., 14:4683.

Термины "сигнальная последовательность", "сигнальный пептид", "лидерная последовательность" или "лидерный пептид" использованы в данном описании как взаимозаменяемые термины.

Обычно секретируемый слитый белок может иметь правильную укладку Fc-домена и неправильную укладку группировки сурвивина. Безотносительно к какой-либо теории считается, что, когда сурвивин направляется в секреторный путь Fc-группировкой слитого белка Fc-сурвивин, фолдинг сурвивина нарушается, в

особенности из-за того, что сурвивин содержит много цистеинов, которые могли бы участвовать в образовании дисульфидных связей. Правильный фолдинг группировки сурвивина не требуется для активности вакцин по изобретению.

5 В качестве альтернативы слиянию белков с помощью методов генной инженерии для соединения белковых группировок может быть использована химическая конъюгация с использованием стандартных химических кросс-  
10 линкеров.

#### *Нуклеиновые кислоты*

15 В изобретении также предложены нуклеиновые кислоты, кодирующие белки сурвивина немлекопитающих и/или модифицированного сурвивина и слитые белки, включающие сурвивин, такие, как описано выше. Например, нуклеотидная последовательность сурвивина человека соответствует SEQ ID NO: 57, нуклеотидная последовательность SIX сурвивина *Xenopus* соответствует SEQ ID  
20 NO: 58, нуклеотидная последовательность гомолога сурвивина *Xenopus* соответствует SEQ ID NO: 59, нуклеотидная последовательность гомолога сурвивина из полосатого данио соответствует SEQ ID NO: 60, и нуклеотидная последовательность гомолога сурвивина из сома соответствует SEQ ID NO: 61. Предпочтительно данные нуклеиновые кислоты связаны и чередуются с  
25 элементами, которые необходимы для экспрессии в эукариотических клетках, конкретно, в клетках млекопитающих, с образованием кассет для экспрессии. Обычно кассета для экспрессии, кодирующая сурвивин, содержит по меньшей мере один из нижеупомянутых регуляторных элементов, таких как промоторы, энхансеры, интроны, терминаторы, сигналы полиаденилирования и другие.  
30 Предпочтительно содержит промотор млекопитающих. В контексте данного описания "промотор млекопитающих" означает промотор гена, происходящий от промотора, обнаруженного у млекопитающего или у вируса, который нормально размножается в организме млекопитающего. Например, предпочтительные промоторы включают промоторы, которые присутствуют у вирусов, которые  
40 размножаются в клетках млекопитающих, например у цитомегаловируса (CMV), вируса обезьяны 40 (SV40), вируса Эпштейна-Барр (EBV), вируса саркомы Рауса (RSV), обезьяньего вируса Молони, вируса иммунодефицита человека (ВИЧ), вируса опухоли молочной железы мышей (MMTV), или промоторы, происходящие от генов млекопитающих, например от актина, бета-глобина, миозина млекопитающих, или возможно происходящие от генов млекопитающих,  
45 предпочтительно экспрессируемых в антиген-презентирующих клетках, таких как  
50

Fascin или другие АПК (антигенпрезентирующая клетка)-специфические гены, известные в данной области техники. Примером полезного сигнала полиаденилирования является сигнал, происходящий от сигналы полиаденилирования SV40.

Элементы, регулирующие экспрессию, могут направлять экспрессию белков сурвивина во всех эукариотических клетках или могут включать энхансеры, имеющие клеточную специфичность, чтобы направлять экспрессию, например, в антиген-презентирующих клетках. Кроме того, кодирующие области кассет для экспрессии предпочтительно разрабатывать таким образом, чтобы иметь кодоны, которые чаще всего используются в эукариотических клетках, особенно в клетках млекопитающих или человека.

Кассеты для экспрессии по изобретению можно применять для продуцирования белков по изобретению в культивируемых клетках. Поэтому кассеты для экспрессии могут быть связаны с подходящими генами лекарственной устойчивости, участками начала ДНК-репликации и другими элементами, которые облегчают селекцию и репликацию кассет для экспрессии. В одном воплощении последовательности нуклеиновых кислот, образующие кассету для экспрессии, встроены в плазмиду, способную реплицироваться в бактерии. Плазмиды, подходящие для изобретения, могут иметь маркеры для селекции бактериальных клеток, такие как гены антибиотикорезистентности. Альтернативно подходящие плазмиды могут не иметь маркеров антибиотикорезистентности, но возможно могут содержать ген, кодирующий фермент метаболизма, супрессорную тРНК, или другой похожий ген, который в норме должен встречаться в геноме бактерии, не имеющей лекарственной устойчивости. Соответственно, типичное воплощение изобретения представляет собой плазмиду, содержащую нуклеиновую кислоту, кодирующую пептид сурвивина по изобретению, функционально связанную с промотором млекопитающих, без маркера антибиотикорезистентности. Такая плазида может быть трансформирована в бактерию, и затем данная бактерия может быть использована для вакцинации пациента без введения пациенту гена антибиотикорезистентности. Альтернативно такая плазида может быть введена пациенту без живого носителя. Например, такая плазида может быть введена в виде голый ДНК или в виде ДНК, инкапсулированной в гранулы или нанесенной на поверхность гранул.

Кассеты для экспрессии по изобретению могут быть встроены в вирусные геномы, в плазмиды, подходящие для введения голый ДНК, или в бактериальные геномы. В случае вирусных геномов желательно использовать вирусы,

содержащие двухцепочечную ДНК, такие как аденовирус и аденоассоциированный вирус, и РНК-содержащие вирусы, такие как ретровирусы. Кассеты для экспрессии встраивают в геномы таких вирусов с помощью стандартных методик. Соответственно, в изобретении предложены как ДНК-формы, так и РНК-формы нуклеиновых кислот.

#### *Эффекторные молекулы*

В настоящем изобретении также предложены воплощения, которые позволяют пептиду сурвивина немлекопитающих или пептиду модифицированного сурвивина млекопитающих функционировать во взаимодействии с эффекторной молекулой, которая способствует иммунному ответу. Такой эффекторной молекулой может являться, например, цитокиновая группировка, включающая IL-2, IL-7, IL-12, IL-18, IL-21, IL-23, GM-CSF, но не ограниченная ими, или любой другой цитокин, в особенности цитокин, способный вызывать иммунный ответ Th1-типа. Такой эффекторной молекулой также может являться ингибитор цитокина, который подавляет иммунную систему, например, STAT3-ингибитор (например доминантно-негативный STAT3-белок, такой как STAT3 $\beta$ ). Цитокины или другие эффекторные молекулы также могут содержать мутации. Например, цитокин может содержать замену на Ser в позиции, соответствующей Cys125 в IL-2.

Соответственно, в предпочтительных воплощениях вакцина по изобретению содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую пептид сурвивина немлекопитающих или модифицированного сурвивина млекопитающих и второй пептид, включающий эффекторную молекулу, описанную выше, которая способствует иммунному ответу. Области, кодирующие пептид сурвивина немлекопитающих или модифицированного сурвивина млекопитающих и пептид эффекторной молекулы, могут находиться в одной транскрипционной единице или в двух отдельных транскрипционных единицах. Альтернативно вакцина по изобретению содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую пептид сурвивина немлекопитающих или модифицированного сурвивина млекопитающих, и отдельную нуклеиновую кислоту, кодирующую второй пептид, включающий эффекторную молекулу, описанную выше, которая способствует иммунному ответу.

В других воплощениях вакцина по изобретению содержит пептид сурвивина немлекопитающих или модифицированного сурвивина млекопитающих и второй пептид, включающий эффекторную молекулу, описанную выше, которая способствует иммунному ответу. В одном воплощении пептид сурвивина

немлекопитающих или модифицированного сурвивина млекопитающих слит или конъюгирован с пептидом, включающим эффекторную молекулу. Слитый белок, образованный слиянием пептида сурвивина и эффекторной молекулы, может быть дополнительно слит или конъюгирован с Fc-группировкой, такой, как описано выше.

#### *Введение*

Вакцины по изобретению применяют в лечении людей или млекопитающих, у которых обнаружены заболевания, ассоциированные со сверхэкспрессией сурвивина, или в лечении людей или млекопитающих с повышенным риском таких заболеваний. Такие заболевания включают рак или другие опухоли, характеризующиеся присутствием клеток, сверхэкспрессирующих сурвивин.

Вакцины, получаемые согласно настоящему изобретению, могут быть введены хозяину-млекопитающему любым путем. Чтобы вызвать иммунные ответы у млекопитающих, обычно используют инъекцию белковых антигенов. Однако вакцины по изобретению также могут быть доставлены АПК с помощью нуклеиновой кислоты, например, путем ДНК-инъекции. Обычно используемая методика представляет собой инъекцию ДНК-экспрессирующих векторов, кодирующих антигенный белок, в мышцу. Считается, что специализированные АПК, например макрофаги и дендритные клетки, мигрируют к месту инъекции или введения, поглощают и презентуют антиген в ходе процесса, известного как презентация антигена.

Соответственно, подходящим введением может являться пероральное введение или парентеральное введение, включая внутривенный и внутрибрюшинный пути введения. Кроме того, введение может осуществляться путем периодических инъекций болюса вакцины или может быть сделано более продолжительным с помощью внутривенного или внутрибрюшинного введения из резервуара, который является наружным (например из в/в баллона). В некоторых воплощениях вакцины по настоящему изобретению могут относиться к фармацевтической категории. Это означает, что некоторые воплощения удовлетворяют стандартам контроля чистоты и качества, предъявляемым при введении людям. Применения в ветеринарии также соответствуют значению, предполагаемому в контексте данного описания.

Препараты вакцин по настоящему изобретению, как для ветеринарии, так и для медицинского применения, обычно включают такие вакцины совместно с фармацевтически приемлемым адъювантом, носителем и возможно другим(и)

ингредиентом(ами). Носитель(и) может (могут) быть "приемлемым(и)" в смысле быть совместимым с другими ингредиентами препаратов и неопасным для его реципиента. Предполагается, что фармацевтически приемлемые носители, в этом смысле, включают все без исключения растворители, дисперсионные среды, покрытия, противогрибковые агенты, изотонические агенты и агенты, задерживающие абсорбцию, и тому подобное, совместимые с фармацевтическим введением. Использование таких сред и агентов для фармацевтически активных веществ является известным в данной области техники. За исключением тех случаев, когда какая-нибудь стандартная среда или агент являются несовместимыми с активным соединением или его вектором введения, их использование в композициях предполагается. Дополнительные активные соединения (идентифицированные по изобретению и/или известные в данной области техники) также могут быть включены в композиции. Обычно препараты могут быть представлены в стандартной лекарственной форме и могут быть приготовлены с помощью любой из методик, хорошо известных в области фармации/микробиологии. В общем случае некоторые препараты приготавливают путем получения продукта, содержащего вакцину совместно с жидким носителем, или тонкоизмельчённым твердым носителем, или обоими, и, при необходимости, последующего его формования с получением желаемого препарата.

Вакцинную композицию по изобретению приготавливают в виде препарата, который совместим с его предполагаемым путем введения. Примеры путей введения включают пероральное или парентеральное, например внутривенное, интрадермальное, ингаляционное, трансдермальное (местное), трансмукозальное и ректальное введение. Растворы или суспензии, используемые для парентерального, интрадермального или подкожного введения, могут включать следующие компоненты: стерильный разбавитель, такой как вода для инъекции, физиологический раствор, жирные масла, полиэтиленгликоли, глицерин, пропиленгликоль или другие синтетические растворители; антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота или гидросульфит натрия; хелатирующие агенты, такие как этилендиаминтетрауксусная кислота; буферные агенты, такие как ацетаты, цитраты или фосфаты, и агенты для юстирования тоничности, такие как хлорид натрия или декстроза. pH может быть подведен кислотами или основаниями, например соляной кислотой или гидроксидом натрия.

Растворы, полезные при пероральном или парентеральном введении, могут быть приготовлены с помощью любой из методик, хорошо известных в фармацевтической области, например описанных в Remington's Pharmaceutical

Sciences, (Gennaro, A., ed.), Mack Pub., 1990. Препараты для парентерального введения также могут включать гликохолат для трансбуккального введения, метоксисалицилат для ректального введения или лимонную кислоту для вагинального введения. Парентеральный препарат может быть помещен в ампулы, одноразовые шприцы или флаконы для многократной дозы, сделанные из стекла или пластика. Суппозитории для ректального введения также могут быть приготовлены путем смешивания лекарства с невызывающим раздражение эксципиентом, таким как масло какао, другие глицериды или другие композиции, которые являются твердыми при комнатной температуре и жидкими при температуре тела. Препараты также могут включать, например, полиалкиленгликоли, такие как полиэтиленгликоль, масла растительного происхождения, гидрогенизированные нафталины и тому подобное. Препараты для прямого введения могут включать глицерин и другие композиции высокой вязкости. Другие потенциально полезные для данных вакцин парентеральные носители включают частицы сополимера этилена и винилацетата, осмотические насосы, имплантируемые инфузионные системы и липосомы. Препараты для ингаляционного введения могут содержать в качестве эксципиентов, например, лактозу, или могут представлять собой водные растворы, содержащие, например, додецилнонагликоль (polyoxyethylene-9-lauryl ether), гликохолат и дезоксихолат, или масляные растворы для введения в форме назальных капель, или гель для интраназального введения. Для ректальной доставки также могут быть использованы удерживающие клизмы.

Препараты по настоящему изобретению, подходящие для перорального введения, могут находиться в форме дискретных единиц, таких как капсулы, желатиновые капсулы, саше, таблетки, пастилки или лепешки, каждая из которых содержит заданное количество лекарства; в форме порошка или гранул; в форме раствора или суспензии в водной жидкости или неводной жидкости или в форме эмульсии типа масло в воде или эмульсии типа вода в масле. Вакцина также может быть введена в форме болюса, электуария или пасты. Таблетка может быть приготовлена путем прессования или формования лекарства возможно с одним или более чем с одним дополнительным ингредиентом. Прессованные таблетки могут быть приготовлены путем прессования, в подходящей машине, лекарства в сыпучей форме, такой как порошок или гранулы, возможно смешанного со связующим веществом, смазывающим веществом, инертным разбавителем, поверхностно-активным или диспергирующим агентом. Формованные таблетки могут быть приготовлены путем формования, в подходящей машине, смеси

порошкообразного лекарства и подходящего носителя, увлажненной инертным жидким разбавителем.

Пероральные композиции обычно включают инертный разбавитель или пищевой носитель. С целью приготовления вакцины для перорального введения активное соединение может быть смешано с эксципиентами. Пероральные композиции для применения в качестве жидкости для полоскания рта, приготовленные с использованием жидкого носителя, включают соединение, находящееся в жидком носителе, и применяются перорально, и после полоскания рта выплевываются или проглатываются. Как часть композиции могут быть включены фармацевтически совместимые связующие агенты и/или адъювантные вещества. Таблетки, пилюли, капсулы, пастилки и тому подобное могут содержать любой из следующих ингредиентов или соединений такой же природы: связующее вещество, такое как микрокристаллическая целлюлоза, трагакантовая камедь или желатин; эксципиент, такой как крахмал или лактоза; разрыхлитель, такой как альгиновая кислота, Primogel или кукурузный крахмал; смазывающее вещество, такое как стеарат магния или Sterotes; скользящее вещество, такое как коллоидный диоксид кремния; подслащивающий агент, такой как сахароза или сахарин; или корригент, такой как мятное масло, метилсалицилат или апельсиновый ароматизатор.

Вакцинные композиции, подходящие для инъекционного применения, включают стерильные водные растворы (в случае водорастворимой композиции) или дисперсии и стерильные порошки для экстенпорального приготовления стерильных инъекционных растворов или дисперсий. Для внутривенного введения подходящие носители включают физиологический раствор, бактериостатическую воду, Cremophor ELTM (BASF, Parsippany, NJ) или фосфатно-солевой буфер (PBS). Во всех случаях композиция может быть стерильной и может быть текучей в такой степени, чтобы легко проходить через шприц. Она может быть стабильной в условиях изготовления и хранения и может быть защищена от воздействия контаминирующих микроорганизмов, таких как грибы. Носитель может представлять собой растворитель или дисперсионную среду, содержащую, например, воду, этанол, полиол (например глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль и тому подобное) и их подходящие смеси. Подходящая текучесть может поддерживаться, например, путем использования покрытия, такого как лецитин, путем выдерживания требуемого размера частиц в случае дисперсии и путем использования поверхностно-активных веществ. Во многих случаях в композицию обычно предпочтительно включать изотонические агенты,

например, сахара, полиспирты, такие как манитол, сорбит и хлорид натрия. Пролонгированная абсорбция инъекционных композиций может быть обеспечена путем включения в композицию агента, который замедляет абсорбцию, например, моностеарата алюминия и желатина.

Стерильные инъекционные растворы могут быть приготовлены путем смешивания требуемого количества активного соединения в подходящем растворителе с одним из ингредиентов, перечисленных выше, или с комбинацией этих ингредиентов, в соответствии с требованием, с последующей стерилизацией путем фильтрования. Дисперсии обычно приготавливают путем введения активного соединения в стерильный носитель, который содержит базовую дисперсионную среду и другие требуемые ингредиенты из тех, что перечислены выше. В случае стерильных порошков, предназначенных для приготовления стерильных инъекционных растворов, методики приготовления включают вакуумную сушку и лиофилизацию, что позволяет получить порошок активного ингредиента плюс любой дополнительный желаемый ингредиент из их предварительно стерильно отфильтрованного раствора.

Препараты, подходящие для внутрисуставного введения, могут находиться в форме стерильного водного препарата вакцины, который может находиться в микрокристаллической форме, например, в форме водной микрокристаллической суспензии. Чтобы предложить вакцину как для внутрисуставного, так и для глазного введения, также могут быть использованы липосомальные препараты или биodeградируемые полимерные системы.

Препараты, подходящие для местного введения, включают жидкие или полужидкие препараты, такие как линименты, лосьоны, гели, аппликации, эмульсии типа масло в воде или вода в масле, такие как кремы, мази или пасты; или растворы или суспензии, такие как капли. Препараты для местного введения на поверхность кожи могут быть приготовлены путем диспергирования вакцины с дерматологически приемлемым носителем, таким как лосьон, крем, мазь или мыло. В некоторых воплощениях являются полезными носители, способные образовывать на коже пленку или слой, которые локализуют аппликацию и препятствуют ее удалению. Когда адгезия к тканевой поверхности является желательной, композиция может включать вакцину, диспергированную в фибриноген-тромбиновой композиции или других биоадгезивных веществах. Затем вакцина может быть нанесена на тканевую поверхность в желательном месте путем смазывания, распыления или введения иным способом. Для местного введения на внутренние тканевые поверхности агент может быть диспергирован в

жидком тканевом адгезивном веществе или другом известном веществе, которое повышает адсорбцию тканевой поверхностью. Например, для получения эффекта могут быть использованы растворы гидроксипропилцеллюлозы или фибриногена/тромбина. Альтернативно могут быть использованы растворы для тканевого покрытия, например препараты, содержащий пектин.

Для ингаляционного лечения может быть использована ингаляция порошка (аэрозольные (self-propelling) препараты или препараты в форме спрея), диспергируемого с помощью пульверизатора, небулайзера или атолизатора. Такие препараты могут находиться в форме тонко измельченного порошка для пульмонального введения из устройств для порошковой ингаляции или представлять собой аэрозольные (self-propelling) препараты, содержащие диспергированный порошок. В случае аэрозольных (self-propelling) препаратов, содержащих раствор, и препаратов в форме спрея эффект может быть достигнут либо путем выбора клапана, обеспечивающего желаемые характеристики спрея (то есть способного давать спрей, имеющий желаемый размер частиц), либо путем включения активного ингредиента в виде суспендированного порошка в частицы контролируемого размера. При введении путем ингаляции вакцины также могут быть доставлены в форме аэрозольного спрея из аэрозольного контейнера или диспенсера, который содержит подходящий пропеллент, например, газ, такой как двуокись углерода, или из небулайзера. Также могут быть использованы назальные капли.

Системное введение также может быть осуществлено трансмукозальными или трансдермальными средствами. В препарате для трансмукозального или трансдермального введения используют пенетранты, подходящие для преодоления соответствующего барьера. Такие пенетранты обычно известны в данной области техники и включают, например, для трансмукозального введения, детергенты, соли желчных кислот и производные фузидовой кислоты. Трансмукозальное введение может быть выполнено путем использования назальных спреев или суппозитория. Вакцины для трансдермального введения обычно готовят в виде препаратов в форме мазей, бальзамов, гелей или кремов, обычно известных в данной области техники.

В одном воплощении вакцины приготавливают вместе с носителем, который должен защищать от быстрой элиминации из организма, например в виде препарата с контролируемым высвобождением, включая имплантаты и микроинкапсулированные системы доставки. Могут быть использованы биodeградируемые биосовместимые полимеры, такие как этиленвинилацетат,

полиангидриды, полигликолевая кислота, коллаген, полиортоэфиры и полимолочная кислота (polylactic acid). Методики приготовления таких препаратов обычно очевидны специалистам в данной области техники. Указанные вещества также могут быть приобретены у Alza Corporation и Nova Pharmaceuticals, Inc. В качестве фармацевтически приемлемых носителей также могут быть использованы липосомальные суспензии. Эти суспензии могут быть приготовлены в соответствии с методиками, известными специалистам в данной области техники, например таким образом, как описано в патенте США US 4 522 811. Также могут быть использованы микросомы и микрочастицы.

Пероральные или парентеральные композиции могут быть приготовлены в виде препарата в стандартной лекарственной форме для удобного введения и единообразия дозировок. Стандартная лекарственная форма относится к физически дискретным единицам, пригодным в качестве однократных доз для субъекта, подлежащего лечению; каждая единица содержит заданное количество активного соединения, рассчитанное с целью получения желаемого эффекта вакцины совместно с требуемым фармацевтическим носителем. Спецификация стандартных лекарственных форм по изобретению диктуется уникальными характеристиками активного соединения и конкретным эффектом, который должен быть достигнут от использования вакцины, и ограничениями, накладываемыми в данной области техники на приготовление препарата такого активного соединения, предназначенного для лечения индивидуумов, и напрямую зависит от всего этого.

Обычно идентифицированные вакцины по изобретению могут быть приготовлены в виде препарата для парентерального или перорального введения людям или другим млекопитающим, например, в терапевтически эффективных количествах, например в количествах, которые обеспечивают подходящие концентрации лекарства в ткани-мишени в течение времени, достаточного для получения желаемого эффекта. Кроме того, вакцины по настоящему изобретению могут быть введены сами по себе или в комбинации с другими известными молекулами, которые оказывают благоприятное действие на конкретное заболевание или представляют интерес с точки зрения показаний. Полезные кофакторы, приведенные исключительно в качестве примера, включают кофакторы, смягчающие симптомы, включая антисептики, антибиотики, противовирусные и противогрибковые агенты и анальгетики и анестезирующее средства.

Эффективная концентрация идентифицированных вакцин по изобретению, которая должна быть доставлена с вакцинной композицией, обычно меняется в

зависимости от ряда факторов, включая конечную требуемую дозу лекарства, которая будет введена, и путь введения. Предпочтительная доза, которую следует ввести, также, вероятно, зависит от таких характеристик, как тип и степень

5 заболелания или показания для лечения, общее состояние здоровья конкретного пациента, относительная биологическая эффективность доставляемой вакцины, препарат вакцины, наличие и тип эксципиентов в препарате и путь введения. В

10 некоторых воплощениях вакцины по данному изобретению могут быть предложены для индивидуального использования в стандартных дозах, рассчитанных на основе ранее описанных исследований на млекопитающих, с использованием приматов, не относящихся к виду человека, и грызунов. Как описано выше, стандартная доза

15 относится к унитарной, то есть однократной дозе, которую можно вводить пациенту и которая может быть легко приготовлена и расфасована, оставаясь при этом физически и биологически стабильной стандартной дозой, содержащей либо вакцину как таковую, либо смесь вакцины с твердыми или жидкими

20 фармацевтическими разбавителями или носителями.

*Конфигурация нуклеиновой кислоты сурвивина для доставки с помощью гранул*

25

В другом воплощении нуклеиновые кислоты по изобретению могут быть конфигурированы с носителем для доставки, таким как гранула. Например, нуклеиновая кислота по изобретению может быть нанесена в виде покрытия на

30 целлюлозные гранулы в соответствии с методикой, описанной в публикации заявки на патент США US 2003-0166594, идеи которой настоящим включены в данное описание посредством ссылки. Нуклеиновая кислота по изобретению может быть

35 введена внутрь полимерных гранул в соответствии с методикой, описанной в патенте США US 5 783 567, идеи которого настоящим включены в данное описание посредством ссылки.

В некоторых воплощениях для продуцирования сурвивина по изобретению

40 получены рекомбинантные организмы (например бактерии, клетки млекопитающих и вирусные частицы). Данные организмы могут высвобождать сурвивин для его сбора или могут быть введены в качестве вакцины непосредственно пациенту.

*Конфигурация нуклеиновой кислоты сурвивина для доставки внутри вируса*

45

Нуклеиновые кислоты по изобретению могут быть конфигурированы с

50 вирусным носителем для доставки. Вирусный носитель для доставки возможно

может иметь эффект адъюванта. Например, подходящие вирусы включают аденовирус, аденоассоциированный вирус, ретровирус или вирус осповакцины, но не ограничены ими. Часто предпочтительно использовать мутантную или поврежденную (crippled) форму вируса, такую как некомпетентный по репликации вирус. Нуклеиновые кислоты по изобретению встраивают в вирусные геномы и дополнительно включают в вирусные частицы. Нуклеиновые кислоты упаковывают с использованием систем вирусов-помощников, которые хорошо известны в данной области генной терапии.

#### *Конфигурация нуклеиновой кислоты сурвивина для доставки внутри бактерий*

Нуклеиновые кислоты по изобретению могут быть конфигурированы для доставки внутри микроба-хозяина, как, например, описано Gentschev *et al.* (2000) J. Biotechnol., 83:19-26; или Stocker BAD (2000) J. Biotechnol., 83:45-50, идеи каждой из данных работ включены настоящим посредством ссылки. Подходящие бактерии для доставки нуклеиновой кислоты (например ДНК) включают *Salmonella*, *Shigella*, *Listeria* или *E. coli*, но не ограничены ими. Часто предпочтительно использовать мутантную, ослабленную форму бактерии, такую как ауксотроф. Например, подходящие штаммы *Salmonella* включают *Salmonella typhimurium aroA* ауксотроф SL7202 (смотри, например, Darji *et al.*, (1997) Cell, 91:765-775), *Salmonella typhimurium aroA*, *dam*<sup>-</sup> ауксотроф RE88 (смотри, например, Heithoff *et al.*, (1999) Science, 284:967-70), *Salmonella typhimurium msb*<sup>-</sup>, *purI* ауксотроф VNP20009 (смотри, например, Clairmont *et al.*, (2000) J. Infect. Dis., 181(6):1996-2002; Low, *et al.*, (2004) Methods Mol. Med., 90:47-60) или *Salmonella typhimurium* прототроф LT2 (ATCC #700720), но не ограничены ими. Типичный режим ДНК-вакцинации с использованием *Salmonella* приведен на Фигуре 4.

#### *Комбинированная терапия*

Вакцина по изобретению может быть комбинирована с другими лечебными методиками, используемыми в медицинском обслуживании пациента. В одном воплощении лечения вакцину применяют в сочетании с хирургической резекцией опухоли. В другой совокупности воплощений лечения вакцину применяют в комбинации с химиотерапией или рентгенотерапией, которые уменьшают размер опухоли, потенциально разрушают сосудистую сеть опухоли или делают опухоль чувствительной к иммунным ответам. Химиотерапевтические или рентгенотерапевтические агенты, особенно полезные для комбинированной

терапии с вакциной по изобретению, включают ДНК-повреждающие агенты, такие как циклофосфамин; антиметаболиты, такие как гемцитибин (gemcitabine); и агенты, которые нарушают функционирование цитоскелета, такие как таксолы, но не ограничены ими. Такие агенты уменьшают опухолевый рост и могут разрушать опухолевую сосудистую сеть, что, как считается безотносительно к какой-либо теории, делает опухоль более чувствительной к иммунным ответам.

В комбинированной терапии введение вакцины обычно следует за химиотерапией или облучением таким образом, чтобы формирование эффективного противоопухолевого иммунного ответа не нарушалось возможными остаточными эффектами предшествующего лечения.

В дополнительном воплощении комбинированной терапии лечение вакциной может быть комбинировано с лечением иммуноцитоклином. Безотносительно к какой-либо теории считается, что вакцина вызывает более эффективный иммунный ответ, когда присутствие цитокина в микроокружении опухоли способствует иммунному ответу. Например, особенно полезными иммуноцитоклинами являются те, которые вызывают ответ Th1-типа, например IL-2 или IL-12. В ходе комбинированной терапии, например, пациент может сначала получить вакцину по изобретению, чтобы вызвать иммунный ответ, направленный против опухоли, затем иммуноцитоклин, который может воздействовать на опухолевые клетки-мишени и поддерживать в опухоли иммунный ответ. Обычно предпочтительные иммуноцитоклины имеют, например, группировку антитела, которая распознает поверхностный антиген, характерный для опухоли, такой как ЕpCAM (молекула адгезии эпителиальных клеток), или которая распознает признаки некротического ядра опухоли, такие как ДНК. Обычно иммуноцитоклины также имеют цитокиновую группировку, такую как IL-2, IL-12, или другие, которые предпочтительно направляют ответ Th1-типа. Иммуноцитоклины, подходящие для изобретения, описаны в патенте США US 5 650 150, содержание которого настоящим включено посредством ссылки.

## ПРИМЕРЫ

Практическое осуществление изобретения будет более понятным из следующих примеров, которые представлены в данном описании только с целью иллюстрации и никоим образом не должны быть истолкованы как ограничение изобретения.

Пример 1. Клонирование куриного сурвивина, создание вариантов куриного сурвивина, конструирование плазмид, которые реплицируются в *Salmonella* и экспрессируют куриный сурвивин в клетках млекопитающих.

5  
10  
15  
20  
25  
30  
35  
40  
45  
50

Методики выделения требуемых молекул ДНК хорошо известны специалистам в данной области техники. Например, когда последовательность требуемой молекулы ДНК известна, обычно используют реакцию обратной транскрипции и полимеразную цепную реакцию (ОТ-ПЦР) или молекула ДНК может быть получена путем химического синтеза (такая ДНК может быть приобретена у коммерческой фирмы-поставщика, например Blue Heron Biotechnology Inc. (Bothwell, WA)). Для получения ДНК, кодирующей куриный сурвивин дикого типа, ОТ-ПЦР выполняли на polyA<sup>+</sup> мРНК, выделенной из печени курицы (BD Biosciences cat # 636307), с использованием набора Superscript One-Step RT-PCR for Long Templates Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA) и набора внешних праймеров на первом этапе обратной транскрипции и амплификации и набора Supermix High Fidelity Kit (Invitrogen) и набора внутренних праймеров на втором этапе амплификации. Внешними праймерами являлись смысловой праймер 5'-GAAAAATGGCGGCCTATGC-3' (SEQ ID NO: 17) и антисмысловой праймер 5'-CACCGTAGACCCAGAGGAACC-3' (SEQ ID NO: 18), и внутренними праймерами являлись смысловой праймер 5'-CTCTAGAATGGCGGCCTATGCTG-3' (SEQ ID NO: 19), содержащий рестрикционный сайт XbaI (подчеркнут), и антисмысловой праймер 5'-CCTCGAGACCTAAGGGCCCATGTTCTC-3' (SEQ ID NO: 20), содержащий рестрикционный сайт XhoI (подчеркнут), соответственно. Амплифицированный ПЦР-продукт отделяли путем гель-электрофореза, выделяли, клонировали в вектор pCR2.1 (Invitrogen), и подтверждали его последовательность. Нуклеотидная и аминокислотная последовательности куриного сурвивина дикого типа приведены в перечне последовательностей как SEQ ID NO: 21 и SEQ ID NO: 11, соответственно.

40  
45  
50

Фрагмент нуклеиновой кислоты, кодирующий полноразмерный куриный сурвивин дикого типа, переносили в экспрессирующие векторы, подходящие для его экспрессии в клетках млекопитающих. Например, XbaI/XhoI-расщепленный фрагмент кодирующей последовательности куриного сурвивина дикого типа встраивали в плазмиду pdCs (смотри Lo *et al.*, (1998) Protein Engineering 11:495), расщепленную аналогичным образом, помещая ген куриного сурвивина дикого типа под контроль CMV-промотора.

В качестве другого примера, фрагмент, кодирующий куриный сурвивин дикого типа, встраивали в экспрессирующий вектор pdCs-huFc (смотри Lo *et al.*, (1998) Protein Engineering 11:495), помещая фрагмент полноразмерного куриного сурвивина дикого типа, потерявший стартовый метионин, в направлении транскрипции ниже последовательности, кодирующей Fc человека, с образованием плазмиды, кодирующей слитый белок huFc-ChickenSurvivin. Вкратце, выполняли тройное лигирование смеси PflMI/XhoI-фрагмента куриного сурвивина дикого типа (сайт PflMI находится в позиции, соответствующей 26 нуклеотиду куриного сурвивина дикого типа), SmaI/XhoI-фрагмента плазмиды pdCs-huFc (смотри Lo *et al.*, (1998) Protein Engineering 11:495) и олигонуклеотидной двунитевой молекулы адаптера, которая восстанавливает 5'-конец последовательности куриного сурвивина дикого типа за исключением стартового ATG-кодона. Данную двунитевую молекулу адаптера получали путем гибридизации комплементарных олигонуклеотидов, смыслового олигонуклеотида 5'-GGGTGCAGCGGCCTATGCTGAAATGCTGCCCAAGGA-3' (SEQ ID NO: 22) и антисмыслового олигонуклеотида 5'-TTGGGCAGCATTTCAGCATAGGCCGCTGCACCC-3' (SEQ ID NO: 23). Образование корректно кодируемого слитого белка подтверждали путем секвенирования. Нуклеотидная последовательность зрелого human Fcγ1-ChickenSurvivin (ChickenSurvivin минус стартовый Met) соответствует в перечне последовательностей SEQ ID NO: 24.

Для получения экспрессирующего вектора, кодирующего muFc-ChickenSurvivin, SmaI/XhoI-расщепленный фрагмент куриного сурвивина дикого типа переносили из pdCs-huFc-ChickenSurvivin в обработанный аналогичным образом экспрессирующий вектор pdCs-muFc с образованием химерной последовательности muFc и куриного сурвивина дикого типа, где куриный сурвивин встроен в рамке непосредственно после последовательности, кодирующей CH3-домен muFc. muFc-фрагмент, кодируемый данным экспрессирующим вектором, относится к IgG2a-изотипу. Нуклеотидная последовательность зрелого muFcγ2-Chicken Survivin (ChickenSurvivin минус стартовый Met) соответствует SEQ ID NO:26. Аминокислотная последовательность зрелого mu-Fc-куриный сурвивин соответствует SEQ ID NO:27.

Последовательность куриного сурвивина, кодирующую ChickenSurvivin(N97E, T99M, V100L, Q101G), получали с помощью ПЦР-подхода, включающего использование мутагенных праймеров. Замененные кодоны в мутагенном смысловом праймере (Mut1s) 5'-

CCTCTGAACTGATGTTGGGGGAGTTCTTGAAGCTGGAT-3' (SEQ ID NO: 28) и  
 антисмысловом праймере (Mut1a) 5'-  
 AACTCCCCCAACATCAGTTCAGAGGGATCTTTCTG-3' (SEQ ID NO: 29) выделены  
 5 подчеркиванием, и замена А на G, которая ликвидирует EcoRI-сайт, выделена  
 жирным шрифтом. С ДНК-матрицы куриного сурвивина дикого типа получали два  
 10 перекрывающихся ПЦР-фрагмента, фрагмент, расположенный выше по  
 направлению транскрипции, с использованием для амплификации фланкирующего  
 праймера Pr1s (5'-CCGCGGCCCGCCCCCTTACCCATGGCGGCSTATGCTGAAATG-3')  
 (SEQ ID NO: 30) и Mut1a и фрагмент, расположенный ниже по направлению  
 15 транскрипции, с использованием для амплификации фланкирующего праймера  
 Pr1a (5'-AGATCTGGATCCСТАAGGGCCCATGTTCTCTATC-3') (SEQ ID NO: 31) и  
 Mut1s, соответственно. На полученных ПЦР-фрагментах, смешанных с  
 праймерами Pr1s и Pr1a, проводили ПЦР-реакцию с получением полноразмерного  
 20 продукта, который клонировали в вектор pCR2.1 (Invitrogen), и подтверждали его  
 последовательность. Фрагмент, кодирующий ChickenSurvivin(N97E, T99M, V100L,  
 Q101G) вырезали с помощью рестриктаз NotI/BamHI и лигировали в  
 экспрессирующий вектор pdCs, расщепленный аналогичным образом. Белковая  
 25 последовательность ChickenSurvivin(N97E, T99M, V100L, Q101G) соответствует  
 SEQ ID NO: 12, и аминокислотная последовательность соответствует SEQ ID NO:  
 62.

30 Пример 2. Синтез генов сурвивина от других немлекопитающих и  
 конструирование векторов для экспрессии в клетках млекопитающих

Согласно изобретению в вакцинных композициях используют гены и белки  
 сурвивина из других позвоночных немлекопитающих. Например, ген сурвивина из  
 35 рыбы, такой как рыба-собака, акула, сом или полосатый данио, или из амфибии,  
 такой как жаба *Xenopus*, или из рептилии, такой как аллигатор, крокодил, черепаха,  
 ящерица или саламандра, или из курицы и дополнительно из других птиц получают  
 40 с помощью методик, аналогичных методикам, описанным в Примере 1, или с  
 помощью других методик, известных специалистам в области молекулярной  
 биологии. В некоторых случаях, например для гомологов сурвивина из *Xenopus*,  
 45 полосатого данио, сома и рыбы-собаки (последовательности которых приведены в  
 перечне последовательностей данной заявки), гомологи сурвивина уже описаны и  
 доступны в базах данных открытого доступа, таких как PubMed. Если  
 последовательность гена гомолога сурвивина известна, соответствующая ДНК  
 50

может быть приобретена у коммерческой компании, занимающейся синтезом ДНК, например у Blue Heron Biotechnology (Bothell, WA).

5 Гомологи сурвивина из таких рыб, амфибий, рептилий и птиц  
конфигурированы в вакцинных композициях с помощью методик, аналогичных  
методикам Примеров 3, 4 и 5. Например, гены сурвивина из *Xenopus*, полосатого  
данио, сома и рыбы-собаки после добавления 5' XbaI-сайта и 3' XhoI-сайта к  
10 концам кодирующей последовательности встраивают в плазмиду pdCs. Это  
делают, например, с использованием ПЦР-методик, аналогичных ПЦР-методикам  
Примера 1, или путем синтеза соответствующей кодирующей последовательности,  
фланкированной линкерами, с использованием методики синтеза целого гена.  
15 Затем плазмиду pdCs-сурвивин вводят в штамм *Salmonella* с помощью методик,  
описанных в Примере 3.

Альтернативно гены сурвивина конфигурируют в плазмиды,  
20 экспрессирующие слитые белки Fc-сурвивин таким образом, как в Примере 1, и эти  
слитые белки Fc-сурвивин используют в качестве вакцин. Например, гены  
сурвивина из *Xenopus*, полосатого данио, сома и рыбы-собаки после добавления 5'  
XbaI-сайта и 3' XhoI-сайта к концам кодирующей последовательности встраивают в  
25 плазмиду pdCs. Это делают, например, с использованием ПЦР-методик,  
аналогичных ПЦР-методикам Примера 4, или путем синтеза соответствующей  
кодирующей последовательности, фланкированной линкерами, с использованием  
методики синтеза целого гена. Затем плазмиду Fc-сурвивин вводят в клетки  
30 млекопитающих, используя линию клеток, подходящую для высокого уровня  
экспрессии, такую как NS/O клетки, и полученный секретированный белок собирают  
и очищают таким образом, как в Примере 4, и приготавливают в виде препарата с  
35 адъювантом, и используют для вакцинации людей или животных таким образом,  
как в Примере 5.

#### Пример 3. Конструирование штаммов *Salmonella*, содержащих плазмиды по изобретению

40 Штаммы *Salmonella*, несущие плазмиды по изобретению для применения в  
вакцинации, получали путем описанного ниже стандартного протокола  
электропорации, хорошо известного специалистам в данной области техники.  
45 Например, плазмиду pdCs-ChickenSurvivin трансформировали в штамм *Salmonella*,  
не содержащий плазмид, такой как ослабленный штамм *Salmonella typhimurium*  
*aroA*, SL7207. Также могут быть использованы другие ослабленные штаммы  
50 *Salmonella*, такие как штамм RE88 с генотипом *aroA*, *dam*<sup>-</sup>, штамм VNP20009 с

генотипом *msb<sup>-</sup>*, *purI* или, альтернативно, прототрофный штамм LT2. Также могут быть использованы штаммы *Salmonella typhii*, предпочтительно ослабленные.

Для приготовления электрокомпетентных бактерий собирали 50 мл культуры *Salmonella* в логарифмической фазе роста при OD600 (оптическая плотность при 600 нм) по меньшей мере 0,5, охлаждали на льду, и клетки промывали последовательно равным объемом и затем половинным объемом охлажденного до 0°C 1 mM HEPES и еще раз осаждали центрифугованием. Затем клетки ресуспендировали в 1 мл холодного 10% глицерина, 1 mM HEPES, осаждали центрифугованием и окончательно ресуспендировали в 0,5 мл холодного 10% глицерина, 1 mM HEPES путем мягкого пипетирования. Клетки хранили на льду до дальнейшего использования, или аликвоты хранили при -80°C.

Для электропорации в предварительно охлажденную пробирку для микроцентрифугирования объемом 1,5 мл добавляли 40 микролитров электрокомпетентных бактерий, вносили до 200 нг сверхскрученной плазмиды pdCs-ChickenSurvivin в объеме до 2 микролитров, и смешивали путем пропускания через наконечник. Смесь бактерий и ДНК переносили в предварительно охлажденную кювету с зазором 0,2 см (Bio-Rad, Hercules, CA) и электропорировали электрическим импульсом с параметрами 2500 В, 25 мкФ, 200 ом, которые обычно приводят к значению временной постоянной 4,5 +/- 0,2, затем добавляли 1 мл среды SOC. После инкубации в течение 1 часа при 37°C 0,1 мл клеток высевали на селективные LB-чашки с антибиотиком (ампициллин, 100 микрограмм/мл).

Получали и культивировали изоляты одиночных колоний, и выделяли плазмидную ДНК для подтверждения ее идентичности путем рестрикционного анализа. В свежесывращенную проверенную культуру добавляли до 15% глицерина, аликвоты объемом 500 микролитров быстро замораживали и хранили при -80°C.

#### Пример 4. Трансфекция, экспрессия, предварительная характеристика и очистка слитых белков Fc-сурвивин

##### А. Трансфекция и экспрессия слитых белков Fc-сурвивин

Для быстрого анализа экспрессии белка плазмиды, экспрессирующие, например, muFc-ChickenSurvivin или muFc-muSurvivin, обычно вводят в клеточную линию, такую как эмбриональные клетки почек человека HEK 293 (ATCC# CRL-1573), путем временной трансфекции с использованием липофектамина (Invitrogen).

Например, для получения стабильно-трансфицированных клонов, которые экспрессируют белки Fc-сурвивин, подходящую плазмидную ДНК вводили путем электропорации в клетки миеломы мыши NS/0. NS/0-клетки выращивали в модифицированной по способу Дульбекко среде Игла с добавками 10% инактивированной теплом эмбриональной телячьей сыворотки, 2 мМ глутамин и пенициллина/стрептомицина. Приблизительно  $5 \times 10^6$  клеток один раз промывали PBS и ресуспендировали в 0,5 мл PBS. Затем 10 мкг линейаризованной плазмидной ДНК инкубировали с клетками в кювете Gene Pulser Cuvette (электродный зазор 0,4 см, BioRad, Hercules, CA) на льду в течение 10 мин. Электропорацию выполняли с использованием Gene Pulser (BioRad) с установочными параметрами 0,25 В и 500 мкФ. Клетки регенерировали в течение 10 мин на льду, после чего их ресуспендировали в ростовой среде и высевали в два 96-луночных планшета. Стабильно-трансфицированные клоны отбирали по их росту в присутствии 100 нМ метотрексата (MTX), который добавляли в ростовую среду через двое суток после трансфекции. Клеткам заменяли питательную среду каждые 3 суток, повторяя эту операцию не менее двух - трех раз, и MTX-резистентные клоны появлялись в течение 2 - 3 недель. Для идентификации суперпродуцентов супернатанты клонов анализировали путем анти-Fc ИФА (иммуоферментного анализа). Клоны-суперпродуценты были изолированы и размножены в ростовой среде, содержащей 100 нМ MTX. В качестве ростовой среды обычно использовали среду H-SFM или CD (Invitrogen).

Альтернативно, клоны, стабильно экспрессирующие слитые белки Fc-сурвивин, получают в эмбриональных клетках почки человека НЕК 293 путем селекции метотрексатом с помощью методики, аналогичной методике, описанной выше. НЕК293-клоны поддерживают в среде DMEM с добавкой 10% FBS (фетальной телячьей сыворотки).

#### Б. Очистка и анализ слитых белков Fc-сурвивин

Стандартную очистку Fc-содержащих слитых белков выполняли, основываясь на аффинности Fc-группировки данных белков к белку А. Вкратце, клетки, трансфицированные плазмидой, кодирующей слитый белок Fc-сурвивин, обычно выращивали во вращающихся флаконах в среде H-SFM с добавкой 0,1 мкМ MTX, и клеточный супернатант, содержащий слитый белок, наносили на предварительно уравновешенную (50 мМ фосфат натрия, 150 мМ NaCl, 0,01% Твин 80, нейтральный pH) колонку Protein A Sepharose Fast Flow. Колонку тщательно промывали данным буфером, и связанный белок элюировали при

низком pH (pH 2,5) в том же буфере, описанном выше, и pH фракций подводили до 6,7 с помощью 1 М основного Трис, pH 11.

5 Слитые белки Fc-Survivin, очищенные на Protein A Sepharose, анализировали путем аналитической гель-фильтрации (SEC), и было найдено, что  
обычно большая часть вещества находится в агрегированном состоянии. Данный  
10 результат не являлся неожиданным, поскольку сурвивин в норме представляет собой цитоплазматический белок. Безотносительно к какой-либо теории считают, что, когда сурвивин направляется в секреторный путь Fc-группировкой слитого  
белка Fc-сурвивин, фолдинг сурвивина нарушается, в особенности из-за того, что сурвивин содержит много цистеинов, которые могли бы участвовать в образовании  
15 дисульфидных связей. Поскольку данная агрегация может нарушать биологическую активность, агрегация не является нежелательной, когда белок планируют использовать в качестве вакцины.

20 Целостность и чистоту слитых белков подтверждали с помощью ДСН-ПААГ-электрофореза в присутствии восстановителя. Наиболее интенсивную зону наблюдали в положении, соответствующем приблизительно 45 кД, ожидаемому  
размеру слитого белка. Также присутствовало множество вторичных зон: это является дополнительным доказательством того, что белок действительно  
25 агрегирован.

### В. Методики ИФА (ELISA)

30 Концентрацию Fc-содержащих белковых продуктов в супернатантах МТХ-резистентных клонов и других исследуемых образцов определяли путем анти-Fc ИФА. Стандартные методики, подробно описанные ниже, являлись по существу  
35 следующими.

#### 1. Покрытие планшетов

40 Планшеты для ИФА покрывали AffiniPure Goat anti-murine IgG (H+L) (сывороткой козы против IgG (H+L) мыши) (Jackson Immuno Research Laboratories, West Grove, PA): 5 мкг/мл в PBS, 100 мкл/лунку, 96-луночный планшет (Nunc-Immuno plate Maxisorp). Покрытые планшеты закрывали и инкубировали при 4°C в течение ночи. Затем планшеты промывали 4 раза раствором 0,05% Твина (Твин 20) в PBS и блокировали 1% BSA/1% сывороткой козы в PBS, 200 мкл/лунку. После  
45 инкубации с блокирующим буфером при 37°C в течение 2 часов планшеты промывали 4 раза раствором 0,05% Твина в PBS и осушали бумажными полотенцами.

50

## 2. Инкубация с исследуемыми образцами и вторичным антителом

Исследуемые образцы разбавляли соответствующим образом в буфере для образца (1% BSA/1% сыворотка козы/0,05% Твин в PBS). Калибровочную кривую стоили с использованием химерного антитела (с Fc человека), концентрация которого была известна. Для построения калибровочной кривой делали серию разбавлений в буфере для образца, и получали калибровочную кривую в диапазоне от 125 нг/мл до 3,9 нг/мл. В планшет добавляли разбавленные образцы и стандарты, 100 мкл/лунку, и планшет инкубировали при 37°C в течение 2 ч. После инкубации планшет промывали 8 раз 0,05% Твином в PBS. Затем в каждую лунку добавляли 100 мкл вторичного антитела, конъюгированного с пероксидазой хрена антитела против IgG человека (Jackson Immuno Research), разбавленного в буфере для образца в соотношении приблизительно 1:120000. Точное разбавление вторичного антитела, которое должно быть использовано, варьирует от партии к партии. После инкубации при 37°C в течение 2 ч планшет промывали 8 раз 0,05% Твином в PBS.

### 3). Проявление

В планшет добавляли раствор субстрата в количестве 100 мкл/лунку. Раствор субстрата готовили путем растворения 30 мг OPD (орто-фенилендиамина дигидрохлорида) (1 таблетка в 15 мл буфера 0,025 М лимонная кислота/0,05 М Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 5, который содержит 0,03% свежее-добавленной перекиси водорода). Окрашиванию давали проявляться в течение приблизительно 30 минут при комнатной температуре в темноте. Время проявления следует подбирать, что вызвано вариабельностью покрытия планшетов от партии к партии, использованием разных вторичных антител и так далее. Реакцию останавливают путем добавления 4 н. серной кислоты в количестве 100 мкл/лунку. Планшет считывают на планшет-ридере, который устанавливают одновременно на 490 нм и на 650 нм и программируют таким образом, чтобы вычитать фоновое значение OD при 650 нм из значения OD при 490 нм.

### Пример 5. Методики доставки вакцин и опухолевой провокации

Мышей C57Bl/6 и Balb/c (в возрасте 7-8 недель) приобретали у Jackson Laboratories (Bar Harbour, ME). Мышей поддерживали в EMD Lexigen Research Center Corp., Billerica, MA, и все эксперименты на животных выполняли в соответствии с одобренными операционными процедурами над животными (Animal Facilities Operating Procedures).

Для приготовления образца вакцины на основе *Salmonella* 5 мл LB/AMP инокулировали одной трансформированной бактериальной колонией, выращивали в течение ночи при 37°C, центрифугировали при 2000xg в течение 10 минут, промывали один раз PBS и затем ресуспендировали в 2 мл PBS. Измеряли OD600 данной культуры, используя разбавление в PBS 1:10, и концентрацию культуры доводили PBS до 10<sup>9</sup> клеток/мл, предполагая, что 1 единица OD600 соответствует приблизительно 10<sup>9</sup> бактерий/мл (как определено путем высева серии разбавлений культуры на чашки LB/ампициллин). Вакцинацию путем перорального принудительного кормления выполняли с помощью 1 мл шприца, оснащенного одноразовой иглой для кормления 20G x 1,5", которую вводили в желудок. Мышей предварительно подвергали принудительному кормлению 0,1 мл 10% бикарбоната натрия для нейтрализации желудочных кислот, и через пять минут мышам вводили 0,1 мл образца вакцины (10<sup>8</sup> бактерий).

Эффект вакцины измеряли на линиях опухолевых клеток, которые экспрессируют сурвивин млекопитающих и презентируют антигены, происходящие от сурвивина, на MHC. В нижеприведенных примерах использовали следующие линии опухолевых клеток: линию клеток мышинной карциномы легких D121, линию клеток мышинной лимфомы A20, линию клеток опухоли молочной железы мыши 4T1, линию клеток мышинной карциномы легких Льюиса LLC, линию клеток рака толстой кишки мыши CT26 и линию клеток мышинной меланомы B16, но можно было бы использовать и другие клеточные линии, экспрессирующие сурвивин млекопитающих и презентирующие антигены, происходящие от сурвивина. В некоторых экспериментах использовали линии опухолевых клеток, которые были сконструированы для экспрессии молекулы адгезии эпителиальных клеток (EPCAM) человека, названные "KSA" (например LLC/KSA). Экспрессию сурвивина удобно определять путем вестерн-блоттинга с помощью стандартных методик. Поликлональное антитело кролика против сурвивина человека и мыши (АНР604, Serotec, Raleigh, NC) использовали в разбавлении 1:500.

Линии опухолевых клеток, использованных в нижеприведенных Примерах, поддерживали в следующих средах. D121 выращивали в DMEM с 10% эмбриональной телячьей сывороткой (FBS), с добавками 1% пенициллина/стрептомицина (P/S), 1% L-глутамин, 1% пирувата Na и 1% заменимых аминокислот. A20 и 4T1 выращивали в RPMI с 10% FBS, 1% P/S, 1% L-глутамин. LLC выращивали в DMEM с 10% FBS, 1% P/S, 1% L-глутамин. CT26 выращивали в DMEM с 10% FBS, 1% P/S, 1% L-глутамин и 1% витамина B16. Среда для CT26/KSA также включала 1% пирувата Na и 1% заменимых

аминокислот. Среда для клеточных линий, дополнительно экспрессирующих ЕрСАМ, содержала также 1 мкг/мл G418.

5 Чтобы оценить действие вакцины на выживаемость мышей или на  
опухолевую массу легких мышей, подвергавшихся лечению, опухолевые клетки  
вводили внутривенно. Опухолевые клетки промывали PBS, обрабатывали  
10 трипсином в течение 3 минут, и трипсин нейтрализовали кондиционированной  
средой. Клетки осаждали центрифугованием и дважды промывали PBS или, в  
случае клеток D121, PBS, 1% бычьим сывороточным альбумином, 50 мкМ ЭДТА.  
15 Суспензию одиночных клеток получали в результате нанесения  
ресуспендированных клеток на нейлоновые сита с ячейками 100 мкМ  
многоразового использования (BD Falcon). Мышам инъецировали внутривенно, в  
хвостовую вену, клеточную суспензию в объеме 200 мкл на мышшь с  
использованием иглы 27 калибра. Для сравнения метастатической опухолевой  
20 массы легкие удаляли, взвешивали и оценивали путем определения доли площади  
легких, пораженной опухолью.

Пример 6. Иммунизация с помощью ДНК, кодирующий куриный сурвивин,  
25 приводит к выработке антител, которые перекрестно-реагируют с сурвивином  
млекопитающих.

30 Чтобы проверить, может ли вакцинация нуклеиновыми кислотами,  
кодирующими куриный сурвивин, приводить к выработке антител, которые  
перекрестно реагирует с сурвивином млекопитающих, выполняли следующие  
эксперименты. Для данных экспериментов в качестве основы использовали  
35 протокол иммунизации, описанный Davis ((1996) Adv. Drug Delivery Reviews 21:33).  
Самок мышей Balb/c в возрасте 7 – 8 недель (n=2 на лечебную группу)  
иммунизировали один раз (на 1-е сутки) или три раза (на 1, 21 и 46-е сутки)  
экспрессирующими плазмидами, кодирующими куриный сурвивин дикого типа  
(ChSur), или muFc-ChickenSurvivin (FcChSur), или контрольной экспрессирующей  
40 плазмидой, кодирующей muFc-карциноэмбриональный антиген (CEA) (FcCEA).  
Мышам инъецировали в переднюю большеберцовую мышцу (tibialis anterior  
muscle) 100 мкл 10 мкМ раствора кардиотоксина, затем через пять суток  
инъецировали 100 мкг плазмидной ДНК. На 62-е сутки мышам спускали кровь, и  
45 сыворотку анализировали на присутствие антител против мышшиного сурвивина.  
Серию разбавлений сыворотки наносили на ИФА-планшет, покрытый слитым  
белком muFc-muSurvivin, планшет промывали, образцы инкубировали с антителом  
50 против IgG2a мыши, конъюгированным с пероксидазой. С помощью

колориметрического анализа в данном ИФА было выявлено присутствие антител против сурвивину на фоне негативного контроля (интактные мыши). Результаты, приведенные в Таблице 2 показывают, что ДНК-сурвивин-вакцина являлась эффективной для выработки антител реактивных в отношении мышинного сурвивина, тогда как контрольная ДНК-вакцина не являлась эффективной.

Таблица 2: Титры антител против мышинного сурвивина

Разбавление сыворотки	1-кратное лечение (n =2)			3-кратное лечение (n=2)		
	ChSur	FcChSur	FcCEA	ChSur	FcChSur	FcCEA
50 x	0,285	1,089	n/o	2,176	2,495	0,046
200 x	0,123	0,769	n/o	1,177	1,276	0,042
800 x	0,124	0,484	n/o	0,417	0,454	0,044

n/o –не определяли

Мышиные антитела против сурвивина дополнительно проверяют на перекрестную реактивность против сурвивина человека либо путем вестерн-блоттинга, либо путем ИФА. Ожидается что мышинные антитела против сурвивина, полученные путем вакцинации мышей вакцинной композицией куриного сурвивина, также будут связываться с белком сурвивина человека.

Пример 7. Вакцинация млекопитающего с помощью ДНК, кодирующей сурвивин, вызывает Т-клеточный иммунный ответ на раковые клетки

Для определения способности сурвивин-вакцины на основе *Salmonella* стимулировать Т-клеточный ответ, направленный против раковых клеток, выполняли следующие эксперименты. Мышей Balb/c на 0-е сутки и на 14-е сутки вакцинировали штаммом SL7207 *Salmonella*, несущим мутацию AroA (Medina *et al.*, (1999) *Infection and Immunity*, pp. 1093-1099) и также несущим вектор для экспрессии в клетках млекопитающих, кодирующий мышиный сурвивин (n=2) или куриный сурвивин дикого типа (n=2), в соответствии с тем, как описано в Примере 5. В качестве негативного контроля в данном эксперименте использовали интактных неиммунизованных мышей (n=2).

Через один месяц после первой вакцинации, из каждой группы животных экстрагировали спленоциты, и объединяли их. CD8<sup>+</sup> Т-клетки очищали и использовали в качестве респондеров в ELISpot-анализе (иммуноферментном спот-анализе) мышиного  $\gamma$ -ИФ, по существу так, как описано ниже. В данном анализе в качестве эффекторных клеток использовали опухолевые клетки линий

А20 и 4Т1 (Фигура 6). Клетки линии 4Т1 были сконструированы для экспрессии молекулы адгезии эпителиальных клеток (ЕpCAM) человека, но считали, что эта экспрессия не имеет отношения к данному эксперименту. У вакцинированных мышей имелось значительно больше реактивных Т-клеток, секретирующих  $\gamma$ -ИФ, чем у интактных животных. Вакцинация с помощью *Salmonella*, содержащей плазмиду для экспрессии мышинового или куриного сурвивина, коррелирует с увеличением количества предшественников Т-клеток, секретирующих ИФ $\gamma$ , в ответ на введение различных линий опухолевых клеток.

Такой же протокол вакцинации использовали для мышей линии С57Bl/6. В ELISpot-анализе мышинового  $\gamma$ -ИФ CD8<sup>+</sup> Т-клетки из селезенки этих мышей инкубировали с клетками карциномы легких Льюиса (LLC) или с клетками меланомы В16. Клетки LLC и В16 были сконструированы для экспрессии молекулы адгезии эпителиальных клеток (ЕpCAM) человека, но считали, что эта экспрессия не имеет отношения к данному эксперименту. Обе вакцины вызывали увеличение относительного количества Т-клеток, реактивных в отношении пептидов из антигена-мишени, экспрессируемых в контексте МНС класса I, при сравнении с интактными животными линии С57Bl/6 (Фигура 5). Мыши, вакцинированные SL7207 куриным сурвивином, продуцировали значительно больше клеток, секретирующих  $\gamma$ -ИФ, чем мыши, вакцинированные SL7207 мышинным сурвивином, в ответ на введение как LLC опухолевых клеток, так и В16 клеток.

Рассматриваемые совместно, данные результаты показывают, что обе методики вакцинации вызывают увеличение количества предшественников CD8<sup>+</sup> Т-клеток, реактивных в отношении раковых клеток, презентующих пептиды сурвивина млекопитающих в контексте эпитопов МНС I класса. Эти наблюдения также дают возможность предположить, что иммунизация куриным сурвивином может более эффективно нарушать толерантность и вызывать иммунный ответ, направленный против клеток-мишеней, экспрессирующих сурвивин млекопитающих.

В данном примере и в нескольких следующих примерах использовали штамм *Salmonella typhimurium* SL7207, но можно было бы использовать другие штаммы *Salmonella*, например *Salmonella typhi*. При лечении людей с помощью *Salmonella typhi* обычно предпочтительно использовать ауксотрофы, которые возможно несут дополнительные ослабляющие мутации.

*Протокол ELISpot-анализа мышинового  $\gamma$ -ИФ:*

ELISpot-анализ выполняли по существу так, как описано Power с соавт. (Power *et al.*, (1999) J. Immunol. Meth. 227:99-107). CD8<sup>+</sup> Т-клетки выделяли из спленоцитов с использованием Miltenyi набора для выделения CD8<sup>+</sup> Т-клеток (Miltenyi Biotech, Auburn, CA) и сортировали на сортировщике магнитных гранул Automacs согласно инструкциям производителя. CD8<sup>+</sup> Т-клетки поддерживали в среде RPMI с добавкой 0,7 нг/мл IL-2 (R&D Systems). Не позднее чем через 24 часа видимые клетки очищали на градиенте Lympholyte® и ресуспендировали при конечной концентрации 10<sup>6</sup> клеток/мл. Серию разбавлений CD8<sup>+</sup> Т-клеток начиная с 10<sup>5</sup> клеток/лунку вносили в планшет для ELISpot-анализа мышинового  $\gamma$ -ИФ (BD Biosciences, San Jose, CA), предварительно покрытого 5 мкг/мл антитела против мышинового  $\gamma$ -ИФ. Опухолевые клетки всех линий добавляли в концентрации 5 x 10<sup>4</sup> клеток/лунку. Через 18 - 24 часа клетки удаляли, мембраны с анти- $\gamma$ -ИФ-покрытием промывали 0,05% Твином в PBS, инкубировали с вторичным биотинилированным антителом против  $\gamma$ -ИФ в PBS с 2% эмбриональной телячьей сывороткой, и связанное вторичное антитело визуализировали путем экспозиции в растворе стрептавидин-конъюгированной HRP (пероксидазы хрена) и АЕС (3-амино-9-этилкарбазол)ацетата. Пятна, соответствующие CD8<sup>+</sup> Т-клеткам, секретирующим  $\gamma$ -ИФ, характеризовали количественно с использованием Zeiss KS ELISpot system (Muenchen-Hallergmoss, Germany).

Пример 8. *In vitro* иммунизация иммунных клеток, происходящих от человека, куриным сурвивином

Для подтверждения способности последовательности сурвивина немлекопитающих, такой как последовательность куриного сурвивина, вызывать ответ, направленный против сурвивина, у людей, выполняют *in vitro* анализ иммунизации с использованием клеток периферической крови пациента (hu PBMC). По существу дендритные клетки (DC) и Т-клетки очищают от hu PBMC, к DC добавляют предпочтительный антиген, инкубируют с Т-клетками, и анализируют ответ Т-клеток на экспозицию пептидов сурвивина, например в форме клеток-мишеней, экспрессирующих сурвивин человека, используя стандартные методики, хорошо известные специалистам в данной области техники.

Например, DC (из huPBMC HLA-A2<sup>+</sup>-пациентов и полученные с использованием IL-4 и GM-CSF), стимулируют (pulsed) контрольной известной последовательностью пептида сурвивина, которая является эпитопом для HLA-A2<sup>+</sup> аллелей, например последовательностью LMLGEFLKL (SEQ ID NO: 6), или

стимулируют экспериментальными пептидами, такими как (1) 30-членный пептид, происходящий от куриного сурвивина, GCAFAALQKDPSELMLGFLKLDLDRERAKNV (SEQ ID NO: 32); (2) пептид куриного сурвивина дикого типа или (3) пептид мутированного куриного сурвивина, такого как ChickenSurvivin(N97E,T99M,V100L,Q101G) (SEQ ID NO: 12). Альтернативно в DC вводят ДНК-конструкции, экспрессирующие данные последовательности. После инкубации с пептидом или белком или экспрессии введенной ДНК, DC облучают и промывают для удаления избытка экзогенно добавленного пептида, и затем смешивают с сингенными Т-клетками в присутствии IL-7 и IL-2. Данные Т-клетки повторно стимулируют один раз в неделю путем смешивания культивируемых Т-клеток со заново обработанными и облученными DC.

В одном из анализов присутствие сурвивин-реактивных Т-клеток регистрировали с помощью ELISpot-анализа  $\gamma$ -ИФ по существу так, как описано в Примере 7. Альтернативно для оценки функциональной активности этих клеток использовали стандартный анализ высвобождения [ $^{51}\text{Cr}$ ], в котором опухолевые клетки-мишени, презентующие пептиды сурвивина в контексте молекул МНС класса I, нагружают [ $^{51}\text{Cr}$ ] и инкубируют с Т-клетками, и лизис опухолевых клеток количественно определяют по высвобождению [ $^{51}\text{Cr}$ ]. В качестве отрицательного контроля используют контрольную линию клеток-мишеней, которые не экспрессируют сурвивин. Ожидается, что экспериментальные препараты будут стимулировать Т-клетки, которые являются реактивными, в отношении сурвивина, по меньшей мере так же эффективно как контрольный препарат, что будет свидетельствовать о том, что последовательности, происходящие от куриного сурвивина, могут служить эпитопами, которые направляют специфический иммунный ответ на клетки, экспрессирующие сурвивин человека.

#### Пример 9. Действие вакцинации на рак легких

Следующие эксперименты проводили для того, чтобы определить, может ли иммунный ответ, вызванный вакциной, ингибировать метастатический рост опухоли, когда повторное лечение отложено до тех пор, пока не будет проведена опухолевая провокация.

На 0-е сутки мышей C57Bl/6 (n=5 на лечебный режим) перорально вакцинировали 100 мкл 10% бикарбоната натрия, затем клетками сальмонеллы SL7207 ( $10^8$  клеток), содержащими плазмиду, кодирующую, мутантный куриный сурвивин (ChickenSurvivin((N97E, T99M, V100L, Q101G))); плазмиду, кодирующую muFc-ChickenSurvivin; или плазмиду, содержащую две транскрипционных единицы,

одна из которых кодирует ChickenSurvivin((N97E, T99M, V100L, Q101G), а другая кодирует слитый белок muFc-muIL2 в качестве адъюванта. Контрольных мышей лечили PBS.

Мышам до введения дозы перорально вводили 100 мкл 10% бикарбоната натрия и вводили SL7207 *Salmonella* в PBS (приготовлено так, как описано выше). Через десять суток после первичной вакцинации мышам внутривенно инъецировали суспензию одиночных клеток LCC/KSA,  $1 \times 10^6$  клеток, в 200 мкл PBS, и иммунный ответ усиливали повторной пероральной вакцинацией с использованием той же концентрации *Salmonella*. Мышей умерщвляли на 32 сутки.

Типичные результаты приведены ниже в Таблице (Таблица 3). Данные результаты показывают, что вакцинация *Salmonella*, несущей экспрессирующий вектор с любой из использованных конструкций куриного сурвивина, создает одинаковую защиту против метастатического рака легких.

Таблица 3. Масса легких и оценки метастазирования у мышей с раком легких, подвергавшихся лечению сурвивин-вакциной

	Среднее $\pm$ стандартное отклонение (г)	Оценка опухоли*
PBS	1,12 $\pm$ 0,25	3,3,3,3,3
ChickenSurvivin(N97E,T99M,V100L,Q101G)	0,23 $\pm$ 0,05	<b>1,1,1,1,1</b>
ChickenSurvivin(N97E,T99M,V100L,Q101G) + muFc-muIL2	0,21 $\pm$ 0,13	<b>1,1,2,1,1</b>
muFc-ChickenSurvivin	0,24 $\pm$ 0,03	1,1,1,1,1

В Таблице 3 (\*) опухолевую массу оценивали по шкале 0-3 (0=отсутствие опухоли в легких, 1= <5% опухолевой массы, 2= 5-50% опухолевой массы, 3= >50% легких поражено опухолью.) Курсивом и жирным шрифтом выделены оценки опухоли для мышей, у которых обнаружена экстра-пульмональная опухоль в основании хвоста.

Пример 10. SL7207-опосредованная вакцинация куриным сурвивином или мышинным сурвивином значительно задерживает летальный исход

Чтобы определить, может ли вакцинация штаммом *Salmonella* SL7207, несущим плазмиды для экспрессии сурвивина, уменьшить опухолевую массу и

увеличить выживаемость, мышам Balb/c (n=5 на лечебный режим) перорально путем принудительного питания дважды, с интервалом две недели, вводили дозу PBS, SL7207 *Salmonella*, содержащей плазмиду для экспрессии мышиног  
5 сурвивина, или SL7207 *Salmonella*, содержащей плазмиду для экспрессии куриного сурвивина дикого типа, в соответствии с тем, как описано ранее. Через две недели после повторной вакцинации мышам внутривенно инъецировали 200 мкл PBS-  
10 суспензии ( $5 \times 10^5$  клеток/мл) сингенных клеток CT26/KSA (которые также экспрессировали ЕpCAM-белок человека, что, как считали, не имеет отношения к данному эксперименту). Осуществляли мониторинг выживаемости мышей. Как  
15 показано на Фигуре 7, у мышей, подвергавшихся лечению SL7207 куриным сурвивином, имеется более затяжной профиль выживаемости по сравнению с мышами, подвергавшимися лечению PBS или SL7207 мышиным сурвивином.

Пример 11. Пролонгированная выживаемость млекопитающих с раковыми метастазами как результат вакцинации с помощью *Salmonella*, несущей векторы для экспрессии сурвивина

Чтобы определить, могут ли быть вакцинированы млекопитающие с  
25 предсуществующим раком с помощью *Salmonella*, несущей плазмиды для экспрессии сурвивина, выполняли следующий эксперимент. В данном эксперименте на 0-е сутки мышам C57Bl/6 предварительно вводили 0,1 мл 10% бикарбонат натрия, и затем их перорально вакцинировали приблизительно 100  
30 миллионами клеток салмонеллы SL7207, содержащих вектор для мышиног сурвивина (n=5) или ChickenSurvivin(N97E, T99M, V100L, Q101G) (n=5), в PBS (приготовлено так, как описано выше). Контрольным мышам вводили путем  
35 принудительного питания бикарбонат натрия и PBS (n=5). Через десять суток после первичной вакцинации мышам внутривенно инъецировали 200 мкл PBS-суспензии  $1 \times 10^6$  клеток LLC/KSA (которые также экспрессировали ЕpCAM-белок человека, что, как считали, не имеет отношения к данному эксперименту). У всех  
40 мышей иммунный ответ усиливали повторной пероральной вакцинацией, которую проводили через 4 часа после опухолевой инъекции, используя для введения такую же концентрацию *Salmonella*, как для первичного иммунного ответа.

За выживаемостью мышей наблюдали в течение 12-недельного периода  
45 после опухолевой провокации. Все контрольные мыши погибали в течение 35 суток после введения опухоли. Существенно, что все мыши, вакцинированные одной из конструкций сурвивина, оставались все еще живыми на 35-е сутки. Все мыши в  
50 группе, подвергавшейся лечению SL7207 ChickenSurvivin(N97E, T99M, V100L,



Ранее идентифицированный эпитоп антигена, связывающийся с субтипом HLA-A0201, выделен жирным шрифтом и подчеркнут, и данный эпитоп согласно предсказанию NetChop имеет С-концевой сайт расщепления.

5           Путем использования SYFPEITHI, последовательность huSur(R18E, H77A, C84A, A128P) (SEQ ID NO: 84) анализируют на присутствие эпитопов, связывающихся с HLA-супертипами A2, A3 и B7, которые вместе встречаются  
10           приблизительно по меньшей мере у 85% представителей популяции человека (смотри Sette *et al.*, (1999) Immunogen. 50:201-212). При сравнении huSurvivin дикого типа и вариантного сурвивина найдено, что их ведущие эпитопы для HLA-A 0201 и HLA-A 03 являются идентичными, в отличие от эпитопов для HLA-B 0702,  
15           последовательность вариантного сурвивина дает ведущий эпитоп благодаря более предпочтительному С-концевому якорному остатку, что достигается с помощью замены H77A. Соответственно, пептид EPDDDPIEEA (SEQ ID NO: 33) может представлять собой более хороший антигенный пептид, чем пептид EPDDDPIEEH  
20           (SEQ ID NO: 34).

          Как можно предположить на основании NetChop-анализа, в huSur(R18E, H77A, C84A, A128P) могут быть введены дополнительные замены, такие как P47L и  
25           Q56L, и данная последовательность может быть повторно проанализирована с использованием SYFPEITHI, как описано выше. Последовательность HumanSurvivin(R18E, H77A, C84A, A128P) соответствует SEQ ID NO: 84. Последовательность HumanSurvivin(R18E, P47L, Q56L, H77A, C84A, A128P, I135P)  
30           соответствует SEQ ID NO: 56. Конкретно, мутация P47L усиливает якорную позицию 2 в пептиде CPTENEPDL (SEQ ID NO: 2), который превращается в CLTENEPDL (SEQ ID NO: 35).

          Аналогично, замена Q56L приводит к образованию пептида ALCFFCFKEL (SEQ ID NO: 36) с предпочтительным якорным остатком в позиции 2 по сравнению с AQCFFCFKEL (SEQ ID NO: 37), который согласно предсказанию довольно плохо связывается с HLA-A 0201. По сравнению с huSurvivin дикого типа  
40           последовательность Q56L-вариантного сурвивина дает пептид, который согласно предсказанию является таким же сильным антигеном, как и подтвержденный экспериментально huSurvivin антигенный пептид ELTLGEFLKL (SEQ ID NO: 38) (Andersen *et al.*, (2001) Cancer Res. 61:869-872).  
45

          Согласно изобретению, такой анализ может давать последовательности сурвивина, содержащие высоко антигенные пептиды, к которым CTL (цитотоксические Т-лимфоциты) по всей вероятности не будут толерантны,  
50           например, вследствие того, что ответ вызывают субдоминантные эпитопы.

Пример 13. Лечение рака у пациента (человека) вакциной, содержащий вектор для экспрессии сурвивина немлекопитающих

5 Согласно изобретению у людей лечат рак вакциной по изобретению  
следующим образом. Сначала кандидатов на лечение возможно распределяют по  
категориям с использованием диагностического агента, с помощью которого  
тестируют сверхэкспрессию сурвивина в раковых клетках. Например, образец  
10 опухоли может быть проанализирован с помощью иммунофлюоресцентных  
антител к сурвивину. Альтернативно образец опухоли, полученный от  
потенциального пациента, может быть проанализирован путем гибридизации с  
генным чипом, который регистрирует уровни мРНК сурвивина, путем обратной  
15 транскрипции и ПЦР или с помощью любых других методик, которые регистрируют  
уровни мРНК или белка сурвивина. Пациенты также могут быть распределены по  
категориям в зависимости от готовности отвечать на основе других  
диагностических тестов, таких как тесты для регистрации уровней экспрессии МНС,  
20 уровней молекул сигнальной трансдукции, которые, как известно, участвуют в  
киллинге, опосредованном Т-клетками, или на основе уровней молекул, функция  
которых неизвестна, но которые согласно эмпирическим данным коррелируют с  
чувствительностью к иммунотерапии.

Это является в особенности полезным при выборе пациентов (людей),  
которые перенесли хирургическую резекцию большей части опухоли. Это  
30 позволяет провести диагностический анализ опухоли так, как описано выше. Кроме  
того, безотносительно к какой-либо теории, лечение после хирургической резекции  
благоприятно потому, что большая объемная опухоль может просто оттитровать  
ресурс иммунной системы. Кроме того, опухоли секретируют способные к  
35 диффузии иммунодепрессивные факторы, которые в массивных опухолях  
достигают более высоких концентраций по сравнению с их концентрацией в  
небольших метастазах.

40 Пациенты, которых отбирают на лечение, имеют меланому, карциному  
толстой кишки, рак молочной железы, рак предстательной железы, рак легких, рак  
почки, глиобластому, рак шеи и головы и другие раковые заболевания.

После подходящей диагностики и отбора пациентов, пациентов лечат  
штаммом *Salmonella*, несущим вектор для экспрессии сурвивина немлекопитающих  
45 (вектор для экспрессии сурвивина немлекопитающих в клетке млекопитающего).  
Например, пациент может получать приблизительно  $10^9$  -  $10^{13}$  живых бактерий  
*Salmonella* LT2, несущих плазмиду, в которой экспрессия куриного сурвивина

50

управляется с промотора млекопитающих. Предпочтительно используют приблизительно  $10^{10}$  -  $10^{12}$  бактерий, и более предпочтительно вводят приблизительно  $2 \times 10^{11}$  *Salmonella*. Штамм *Salmonella* представляет собой предпочтительно аукотроф, но могут быть использованы любые штаммы, упомянутые в Примерах.

Обращаясь к вопросу о выживании бактерий *Salmonella* в кислом окружении желудка, следует отметить, что используют две альтернативные методики. Следуя первой методике, пациент сначала проглатывает безопасное, но эффективное количество бикарбоната натрия для нейтрализации желудочной кислоты. Следуя второй методике, бактерии *Salmonella* готовят в виде препарата пилюли с кишечнорастворимым покрытием, которое позволяет проходить через желудок и растворяется в тонкой кишке.

Когда используют бактериальные штаммы *Salmonella typhimurium*, побочные эффекты могут включать легкую диарею; *Salmonella typhimurium* представляет собой естественный мышинный патоген и в норме не является патогенной для человека. Такую легкую диарею предпочтительно лечить симптоматически, а не использовать для лечения антибиотики, поскольку последнее лечение может нарушить эффект данной вакцины.

#### Пример 14. Выбор времени проведения вакцинации относительно времени провокации

Чтобы оценить значение выбора времени проведения вакцинации куриным сурвивином относительно времени опухолевой провокации проводили эксперимент. Мышам вводили дозы *Salmonella*, содержащей плазмиду, кодирующую ChickenSurvivin(N97E, T99M, V100L, Q101G), путем перорального принудительного кормления. Режим введения доз приведен на Фигуре 9. Как видно, пероральное принудительное кормление выполняли на 1 и 13-е сутки; 7 и 13-е сутки; 10 и 18-е сутки; или 13 и 21-е сутки, в то время как внутривенную провокацию клетками LLC/KSA выполняли на 10-е сутки, а опухолевую массу легких оценивали на 29-е сутки. Как показано на Фигуре 10, пероральное принудительное кормление сальмонеллой, содержащей плазмиду, кодирующую ChickenSurvivin(N97E, T99M, V100L, Q101G), являлось эффективным для уменьшения опухолевой массы легких независимо от использованного режима введения доз. Эффект вакцины был более выраженным, когда первичную дозу вакцины вводили более чем за трое суток до провокации опухолевыми клетками.

5 Также оценивали влияние варьирования режимов введения доз на метастазирование легких. Метастазирование легких оценивали следующим образом: мышь, у которой опухолью было поражено более 50% поверхности легких, соответствовала по оценочной шкале 3 баллам; мышь, у которой опухолью было поражено 5-50% поверхности легких, соответствовала по оценочной шкале 2 баллам; мышь, у которой опухолью было поражено менее 5% поверхности легких, соответствовала по оценочной шкале 1 баллу; и мышь, у которой в легких отсутствовали видимые колонии опухоли, соответствовала по оценочной шкале 0 баллов. Как показано на Фигуре 10, режимы введения доз, которые включали первичную дозу до опухолевой провокации, как правило, уменьшали оценку метастазирования легких по сравнению с оценками в случае задержанных режимов введения доз или мышей, которых перорально не иммунизировали ChickenSurvivin(N97E, T99M, V100L, Q101G).

20 Пример 15. Комбинированная терапия с использованием терапии сурвивин-вакциной и химиотерапии

25 Также оценивали эффекты от комбинирования вакцинации против сурвивина и химиотерапии. Протокол исследования приведен на Фигуре 11. Как показано на этой фигуре, мышей, получавших полное лечение, подвергали первичной иммунизации *Salmonella*, несущей плазмиду, кодирующую куриный сурвивин дикого типа, на 1-е сутки. Клетки LLC/KSA вводили внутривенно (провокация) на 4-е сутки. Циклофосфамид (CTX) вводили интраперитонеально на 11-е сутки, и индометацин вводили на 12-15-е сутки. На 15-е сутки мышей подвергали повторному пероральному принудительному кормлению (повторная иммунизация) *Salmonella*, несущей плазмиду, кодирующую куриный сурвивин дикого типа, и на 28-е сутки оценивали опухолевую массу легких.

35 Другие мыши получали только часть лечения, например, получали только: первичную иммунизацию, провокацию и повторную иммунизацию (PCB); провокацию, CTX и индометацин, но не первичную иммунизацию или повторную иммунизацию (C(CI)); первичную иммунизацию, провокацию, CTX и индометацин, но не повторную иммунизацию (PC(CI)); или провокацию, CTX, индометацин и повторную иммунизацию, но не первичную иммунизацию (C(CI)V).

45 Как показано на Фигуре 12, у мышей, получавших только первичную иммунизацию, провокацию и повторную иммунизацию, обнаружено уменьшение опухолевой массы и уменьшение оценки метастазирования легких по сравнению с негативным контролем. CTX и индометацин оказывали сходное влияние на оценку

50

метастазирования легких и вызывали более значительное суммарное уменьшение опухолевой массы. Наименьшие опухолевые массы и наименьшие оценки метастазирования легких наблюдали у мышей, получавших по меньшей мере первичную иммунизацию и СТХ и индометацин, это показывает, что вакцинное лечение и химиотерапию можно совмещать с целью уменьшения опухолевой массы и метастазирования легких.

Пример 16. *Salmonella*-опосредованная вакцинация ДНК, кодирующей сурвивин немлекопитающих, коррелирует с появлением Т-клеток с фенотипом активированных Т-клеток памяти

Лимфоциты периферической крови выделяли из мышей, подвергавшихся лечению РСВ, CI, PC(CI), C(CI)B, или полному лечению (PC(CI)B), которые описаны в предыдущем примере. Чтобы определить, привело ли лечение к появлению активированных Т-клеток памяти, клетки анализировали с помощью проточной цитометрии. Присутствие или отсутствие Т-клеток памяти определяли путем мониторинга клеток с высокой экспрессией CD44 и низкой экспрессией CD3 (CD44<sup>bright</sup> CD3<sup>low</sup>). Как показано на Фигуре 13, мыши, подвергавшиеся лечению в соответствии с протоколом первичная иммунизация – провокация - повторная иммунизация (PCB), демонстрировали Т-клетки с профилем экспрессии D44<sup>bright</sup>, что указывало на появление активированных Т-клеток памяти. Сходные профили наблюдали для каждого из протоколов, которые включали иммунизацию *Salmonella*, несущей плазмиду, кодирующую куриный сурвивин, но не в том случае, когда мышей лечили только с помощью химиотерапии (и не в случае отрицательного контроля).

Пример 17. Комбинированная терапия иммуноцитоклином и вакцинацией ДНК, кодирующей сурвивин немлекопитающих

Чтобы определить, может ли вакцинация с использованием сурвивина немлекопитающих повысить эффективность лечения опухолей, основанного на использовании иммуноцитоклина, на 1-е сутки мышей подвергали провокации клетками LLC/KSA, подкожно, и лечили согласно расписанию, приведенному на Фигуре 14. Мышам, получавшим пероральное принудительное кормление сальмонеллой, несущей плазмиду, кодирующую ChickenSurvivin(N97E, T99M, V100L, Q101G), соответствующую дозу вводили на 4, 11, 18 и 25-е сутки. Иммуноцитоклин, выбранный для использования в данном эксперименте, представлял собой продукт слияния IL-2 с деиммунизованным антителом против

ЕрСАМ, описанный в публикации заявки на патент США 2003-0157054 (US patent application publication 2003-0157054). Мыши, получавшие иммуноцитокин, получали 20 мкг данного иммуноцитокина внутривенно на 8, 9 и 10-е сутки.

Полученная зависимость объема опухолей от времени приведена на Фигуре 15. Для замедления опухолевого роста с течением времени было достаточно либо вакцинации, либо лечения иммуноцитоксином. У мышей, получавших как вакцину, так и иммуноцитокин, опухолевый рост замедлялся даже сильнее; что демонстрировало дополнительное уменьшение скорости опухолевого роста по сравнению только с вакцинацией или только с лечением иммуноцитоксином.

Пример 18: Оценка биологической активности конструкций сурвивина по изобретению

Некоторые из вариантов сурвивина по изобретению сконструированы как биологически инертные. Соответственно, данные белки сами по себе не проявляют антиапоптозную активность, когда экспрессируются в клетках в условиях, которые в норме индуцируют апоптоз, предотвращаемый белком сурвивином дикого типа. Аналогично, данные белки не нарушают активность эндогенного сурвивина дикого типа, защищающую клетки от действия агентов, индуцирующих апоптоз.

Биологическая инертность белка сурвивина может быть исследована с использованием клеток-предшественников лимфоцитов ВаF3. Рост клеток ВаF3 зависит от IL-3, и удалении ростового фактора приводит к их апоптозу, чему может противодействовать активность сурвивина (смотри, например, Ambrosini *et al.*, (1997) Nat. Med. 3:917-921). Клетки ВаF3 трансфицируют плазмидами, кодирующими конструкцию сурвивина по изобретению, белок сурвивин дикого типа или пустую вставку и дополнительно маркерный белок, такой как GFP (зеленый флуоресцирующий белок), с тем чтобы можно было контролировать клетки, экспрессирующие экзогенно введенную ДНК. После завершения трансфекции из среды удаляют IL-3, и наблюдают за апоптозом клеток ВаF3, например, путем определения % выживаемости на 1, 2, 3 и 4-е сутки или путем анализа, свидетельствующего об апоптозе, хорошо известного специалистам в данной области техники, такого как анализ морфологии ядра (конденсации ДНК и фрагментации). Найдено, что тогда как ВаF3, трансфицированные сурвивином дикого типа, остаются в основном жизнеспособными в течение периода времени 4 суток, клетки ВаF3, трансфицированные пустой плазмидой или вариантом сурвивина по изобретению, не остаются жизнеспособными и в основном показывают морфологию ядра, свидетельствующую об апоптозе.

Биологическая инертность конструкции сурвивина по изобретению также может быть исследована с использованием клеток HeLa. Клетки HeLa характеризуются значительными уровнями экспрессии эндогенного сурвивина, и известно, что отдельные мутации, такие как huSurvivin(C84A), действуют в качестве доминантно-негативной формы сурвивина (DN Survivin) и вызывают апоптоз в данных клетках (смотри, например, Li *et al.*, (1999) Nat. Cell Biology 1:461-466). Клетки HeLa трансфицируют плазмидами, кодирующими DN Survivin или конструкцию сурвивина по изобретению и дополнительно маркерный белок, такой как GFP, с тем чтобы можно было контролировать клетки, экспрессирующие экзогенно введенную ДНК. После завершения трансфекции клетки HeLa выращивают в течение 48 часов, фиксируют, ядра окрашивают DAPI (4',6-диамидино-2-фенилиндолом), и с помощью иммунофлуоресцентной микроскопии анализируют морфологию ядра данных клеток. Найдено, что тогда как клетки HeLa, трансфицированные DN Survivin, обычно имеют признаки, указывающие на то, что они подвергаются апоптозу, такие как конденсированные и фрагментированные ядра, клетки HeLa, трансфицированные конструкциями сурвивина по изобретению, растут нормально.

#### Пример 19: Оценка стабильности конструкций сурвивина по изобретению

Для оценки стабильности конструкции сурвивина он может быть экспрессирован с вектора, который дополнительно экспрессирует маркерный белок, такой как GFP, с тем чтобы количество экспрессированного белка сурвивина можно было измерить относительно стандарта. Клетки культуры тканей, такие как клетки ВНК, временно трансфицируют, и уровень экспрессии конструкции сурвивина анализируют путем вестерн-блоттинга, нормализованного относительно маркера экспрессии. Если подходящие антитела против сурвивина не распознают данный белок, могут быть использованы версии этих вариантов с меченым С-концом. Найдено, что по сравнению с сурвином дикого типа некоторые предпочтительные конструкции модифицированного сурвивина по изобретению, например конструкции с множественными дестабилизирующими мутациями, регистрируются на значительно сниженных уровнях.

Кроме того, для определения стационарных уровней можно оценить скорость деградации во время проведения эксперимента. К клеткам в момент времени 0 добавляют ингибитор трансляции циклогексимид, и клетки инкубируют в течение 4 часов. В моменты времени 0, 2, 5, 10, 20, 60 и 240 минут отбирают образцы для вестерн-блоттинг-анализа. Для сравнения скоростей у конструкций

модифицированного сурвивина и сурвивина дикого типа значения нормализуют относительно момента времени 0. Найдено, что некоторые предпочтительные конструкции модифицированного сурвивина по изобретению подвергаются деградации более быстро, чем сурвивин дикого типа.

Чтобы определить, протекает ли деградация по пути, опосредованному протеасомой, клетки инкубируют возможно в присутствии или отсутствии ингибитора протеасомы, такого как лактацистин (2 час, 100 мкМ), и уровни сурвивина снова анализируют путем вестерн-блоттинга. Найдено, что в присутствии лактацистина, варианты сурвивина по изобретению и huSurvivin дикого типа регистрируются на близких уровнях.

## ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

- 5 <110> Merck Patent GmbH  
Gillies, Stephen D.  
Hettmann, Thore A.O.  
Stein, Pascal A.  
Klinz, Stephan G.
- <120> Compositions and Methods for Treating Tumors Presenting Survivin Antigens
- 10 <130> LEX-037
- <150> US 60/721,199  
<151> 2005-09-27
- <160> 84
- 15 <170> PatentIn version 3.3
- <210> 1  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens
- 20 <400> 1  
Leu Thr Leu Gly Glu Phe Leu Lys Leu  
1 5
- 25 <210> 2  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens
- <400> 2  
Cys Pro Thr Glu Asn Glu Pro Asp Leu  
1 5
- 30 <210> 3  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens
- 35 <400> 3  
Glu Pro Asp Leu Ala Gln Cys Phe Phe  
1 5
- 40 <210> 4  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens
- <400> 4
- 45 <210> 5  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence
- 50

<220>  
 <223> fragment of IgG1 hinge region with serine in place of cysteine

<400> 5

5  
 Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys  
 1 5

<210> 6  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

10

<220>  
 <223> modified fragment of mammalian survivin protein

<400> 6

15  
 Leu Met Leu Gly Glu Phe Leu Lys Leu  
 1 5

<210> 7  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Gallus gallus

20

<400> 7

Ser Thr Arg Ala Ala Thr Phe Arg Asn  
 1 5

25

<210> 8  
 <211> 142  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 8

30

Met Gly Ala Pro Thr Leu Pro Pro Ala Trp Gln Pro Phe Leu Lys Asp  
 1 5 10 15

His Arg Ile Ser Thr Phe Lys Asn Trp Pro Phe Leu Glu Gly Cys Ala  
 20 25 30

35

Cys Thr Pro Glu Arg Met Ala Glu Ala Gly Phe Ile His Cys Pro Thr  
 35 40 45

Glu Asn Glu Pro Asp Leu Ala Gln Cys Phe Phe Cys Phe Lys Glu Leu  
 50 55 60

40

Glu Gly Trp Glu Pro Asp Asp Asp Pro Ile Glu Glu His Lys Lys His  
 65 70 75 80

45

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

Thr Leu Gly Glu Phe Leu Lys Leu Asp Arg Glu Arg Ala Lys Asn Lys  
 100 105 110

50

Ile Ala Lys Glu Thr Asn Asn Lys Lys Lys Glu Phe Glu Glu Thr Ala  
 115 120 125

5 Lys Lys Val Arg Arg Ala Ile Glu Gln Leu Ala Ala Met Asp  
 130 135 140

<210> 9  
 <211> 142  
 <212> PRT  
 <213> Canis familiaris

10 <400> 9

Met Gly Ala Pro Thr Leu Pro Pro Ala Trp Gln Pro Phe Leu Lys Asp  
 1 5 10 15

15 His Arg Ile Ser Thr Phe Lys Asn Trp Pro Phe Leu Glu Gly Cys Ala  
 20

Cys Thr Pro Asp Arg Met Ala Glu Ala Gly Phe Ile His Cys Pro Thr  
 35 40 45

20 Glu Asn Glu Pro Asp Leu Ala Gln Cys Phe Phe Cys Phe Lys Glu Leu  
 50 55 60

25 Glu Gly Trp Glu Pro Asp Asp Asp Pro Ile Glu Glu His Lys Lys His  
 65 70 75 80

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

30 Thr Leu Gly Glu Phe Leu Lys Leu Asp Arg Glu Arg Ala Lys Asn Lys  
 100 105 110

Ile Ala Lys Glu Thr Asn Asn Lys Lys Lys Glu Phe Glu Glu Thr Ala  
 115 120 125

35 Lys Lys Val Arg Arg Ala Ile Glu Gln Leu Ala Ala Met Asp  
 130 135 140

<210> 10  
 <211> 140  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

40 <400> 10

Met Gly Ala Pro Ala Leu Pro Gln Ile Trp Gln Leu Tyr Leu Lys Asn  
 1 5 10 15

45 Tyr Arg Ile Ala Thr Phe Lys Asn Trp Pro Phe Leu Glu Asp Cys Ala  
 20 25 30

50

Cys Thr Pro Glu Arg Met Ala Glu Ala Gly Phe Ile His Cys Pro Thr  
 35 40 45  
 5  
 Glu Asn Glu Pro Asp Leu Ala Gln Cys Phe Phe Cys Phe Lys Glu Leu  
 50 55 60  
 Glu Gly Trp Glu Pro Asp Asp Asn Pro Ile Glu Glu His Arg Lys His  
 65 70 75 80  
 10  
 Ser Pro Gly Cys Ala Phe Leu Thr Val Lys Lys Gln Met Glu Glu Leu  
 85 90 95  
 Thr Val Ser Glu Phe Leu Lys Leu Asp Arg Gln Arg Ala Lys Asn Lys  
 100 105 110  
 15  
 Ile Ala Lys Glu Thr Asn Asn Lys Gln Lys Glu Phe Glu Glu Thr Ala  
 115 120 125  
 Lys Thr Thr Arg Gln Ser Ile Glu Gln Leu Ala Ala  
 130 135 140  
 20  
 <210> 11  
 <211> 142  
 <212> PRT  
 <213> Gallus gallus  
 25  
 <400> 11  
 Met Ala Ala Tyr Ala Glu Met Leu Pro Lys Glu Trp Leu Val Tyr Leu  
 1 5 10 15  
 30  
 Val Ser Thr Arg Ala Ala Thr Phe Arg Asn Trp Pro Phe Thr Glu Gly  
 20 25 30  
 Cys Ala Cys Thr Pro Glu Arg Met Ala Ala Ala Gly Phe Val His Cys  
 35 40 45  
 35  
 Pro Ser Glu Asn Ser Pro Asp Val Val Gln Cys Phe Phe Cys Leu Lys  
 50 55 60  
 40  
 Glu Leu Glu Gly Trp Glu Pro Asp Asp Asp Pro Leu Glu Glu His Lys  
 65 70 75 80  
 40  
 Lys His Ser Ala Gly Cys Ala Phe Ala Ala Leu Gln Lys Asp Pro Ser  
 85 90 95  
 45  
 Asn Leu Thr Val Gln Glu Phe Leu Lys Leu Asp Lys Lys Arg Thr Lys  
 100 105 110  
 Asn Val Ile Lys Lys Ala Ile Ser Gln Lys Glu Thr Asp Ile Glu Asp  
 115 120 125  
 50  
 Val Ala Lys Gly Val Arg His Ala Ile Glu Asn Met Gly Pro

130

135

140

5

<210> 12  
 <211> 142  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> chickenSurvivin(N97E, T99M, V100L, Q101G)

<400> 12

10

Met Ala Ala Tyr Ala Glu Met Leu Pro Lys Glu Trp Leu Val Tyr Leu  
 1 5 10 15

15

Val Ser Thr Arg Ala Ala Thr Phe Arg Asn Trp Pro Phe Thr Glu Gly  
 20 25 30

Cys Ala Cys Thr Pro Glu Arg Met Ala Ala Ala Gly Phe Val His Cys  
 35 40 45

20

Pro Ser Glu Asn Ser Pro Asp Val Val Gln Cys Phe Phe Cys Leu Lys  
 50 55 60

Glu Leu Glu Gly Trp Glu Pro Asp Asp Asp Pro Leu Glu Glu His Lys  
 65 70 75 80

25

Lys His Ser Ala Gly Cys Ala Phe Ala Ala Leu Gln Lys Asp Pro Ser  
 85 90 95

Glu Leu Met Leu Gly Glu Phe Leu Lys Leu Asp Lys Lys Arg Thr Lys  
 100 105 110

30

Asn Val Ile Lys Lys Ala Ile Ser Gln Lys Glu Thr Asp Ile Glu Asp  
 115 120 125

Val Ala Lys Gly Val Arg His Ala Ile Glu Asn Met Gly Pro  
 130 135 140

35

<210> 13  
 <211> 157  
 <212> PRT  
 <213> Xenopus laevis

40

<400> 13

Met Leu Ser Ile Ser Pro Ile Val Ser Leu Arg Arg Cys Asp Asn Glu  
 1 5 10 15

45

Pro Ser Met Pro Asp Glu Trp Arg Leu Tyr Asn Leu Ala Thr Arg Leu  
 20 25 30

Arg Thr Phe Ser Asn Trp Pro Phe Thr Glu Asp Cys Ala Cys Thr Pro  
 35 40 45

50

5  
 10  
 15  
 20  
 25  
 30  
 35  
 40  
 45  
 50

Glu Arg Met Ala Glu Ala Gly Phe Val His Cys Pro Thr Asp Asn Ser  
 50 55 60

Pro Asp Val Val Lys Cys Phe Phe Cys Leu Lys Glu Leu Glu Gly Trp  
 65 70 75 80

Gln Pro Glu Asp Asp Pro Met Asp Glu His Lys Lys His Ser Pro Ser  
 85 90 95

Cys Leu Phe Ile Ala Leu Lys Lys Lys Ala Glu Glu Leu Thr Leu Ser  
 100 105 110

Glu Phe Leu Lys Leu Asp Leu Glu His Thr Lys Ile Lys Met Gln Lys  
 115

Gln Met Asn Leu His Ile Glu Arg Phe Gln Ala Lys Ala Asn Glu Val  
 130 135 140

Arg Gly His Leu Glu Lys Leu Asp Ala Asp Glu Thr Gln  
 145 150 155

<210> 14  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 14

Val Val His Phe Phe Lys Asn Ile Val  
 1 5

<210> 15  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 15

Glu Pro Asp Leu Ala Gln Cys Phe Tyr  
 1 5

<210> 16  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 16

Cys Pro Thr Glu Asn Glu Pro Asp Tyr  
 1 5

<210> 17  
 <211> 19  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence

<220>  
 <223> synthetic: outside sense primer

	<400> 17 gaaaaatggc ggcctatgc	19
5	<210> 18 <211> 21 <212> DNA <213> Artificial Sequence	
	<220> <223> synthetic: outside antisense primer	
10	<400> 18 caccgtagac ccagaggaac c	21
15	<210> 19 <211> 23 <212> DNA <213> Artificial Sequence	
	<220> <223> synthetic: inside sense primer incorporating an Xba I restriction site	
20	<400> 19 ctctagaatg gcggcctatg ctg	23
25	<210> 20 <211> 27 <212> DNA <213> Artificial Sequence	
	<220> <223> synthetic: inside antisense primer incorporating an Xho I restriction site	
30	<400> 20 cctcgagacc taagggccca tgttctc	27
35	<210> 21 <211> 429 <212> DNA <213> Gallus gallus	
40	<400> 21 atggcggcct atgctgaaat gctgccaag gaatggctgg tctacctcgt ctccaccgc gccgccacct tccgcaactg gcccttcacc gagggtgctgc cctgcacgcc cgagcggatg gcggcggcgg gcttcgtgca ctgccccagc gagaacagcc cgcacgtggt gcagtgttc	60 120 180
45	ttctgcctca aggagctgga gggctgggag cccgacgacg acccgctgga ggaacacaaa aagcactccg cgggctgcgc ttttgccgct cttcagaaag atccctctaa cctgacggtg caggaattct tgaagctgga taaaaagcgg accaaaaacg taattaaaaa agcaatttct cagaaggaaa ctgatatcga agatgtagcc aagggcgtgc ggcacgcgat agagaacatg ggcccttag	240 300 360 420 429
50	<210> 22 <211> 36	

<212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> synthetic: duplex adapter molecule sense oligo  
  
 5 <400> 22  
 gggTgcagcg gcctatgctg aaatgctgcc caagga 36  
  
  
 <210> 23  
 <211> 33  
 10 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> synthetic: duplex adapter molecule antisense oligo  
  
 15 <400> 23  
 ttgggcagca tttcagcata ggccgctgca ccc 33  
  
  
 <210> 24  
 <211> 1337  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 20 <220>  
 <223> sequence encoding huFc-ChickenSurvivin fusion protein  
  
 <400> 24  
 25 gagcccaaat cttctgacaa aactcacaca tgcccaccgt gcccaggtaa gccagcccag 60  
 gcctcgcctt ccagctcaag gcgggacagg tgccctagag tagcctgcat ccagggacag 120  
 gccccagccg ggtgtgaca cgtccacctc catctcttcc tcagcacctg aactcctggg 180  
 gggaccgtca gtcttctctt tcccccaaaa acccaaggac accctcatga tctcccggac 240  
 30 ccctgaggtc acatgcgtgg tgggtggacgt gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa 300  
 ctggtacgtg gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta 360  
 caacagcacg taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg 420  
 caaggagtac aagtgcaagg tctccaacaa agccctccca gccccatcg agaaaaccat 480  
 35 ctcaaagcc aaaggtggga cccgtggggg gcgagggcca catggacaga ggccggctcg 540  
 gcccacctc tgccctgaga gtgaccgctg taccaacctc tgtccctaca gggcagcccc 600  
 gagaaccaca ggtgtacacc ctgccccat cagggagga gatgaccaag aaccagggtca 660  
 40 gcctgacctg cctggtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag tgggagagca 720  
 atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgctcccgt gctggactcc gacggctcct 780  
 tcttctctta tagcaagctc accgtggaca agagcagggtg gcagcagggg aacgtcttct 840  
 catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc ctctccctgt 900  
 45 ccccgggtgc agcggcctat gctgaaatgc tgccaagga atggctggtc tacctcgtct 960  
 ccaccgcgc cgccacctc cgcaactggc cttcaccga gggctgcgcc tgacgccccg 1020  
 agcggatggc ggcggcgggc ttcgtgact gccccagcga gaacagcccc gacgtggtgc 1080  
 50 agtgcttctt ctgcctcaag gagctggagg gctgggagcc cgacgacgac ccgctggagg 1140

aacacaaaaa gcactccgcg ggctgcgctt ttgccgctct tcagaaagat ccctctaacc 1200  
 tgacgggtgca ggaattcttg aagctggata aaaagcggac caaaaacgta attaaaaaag 1260  
 caatttctca gaaggaaact gatatcgaag atgtagccaa gggcgtgcgg cacgcatag 1320  
 5 agaacatggg cccttag 1337

<210> 25  
 <211> 373  
 <212> PRT  
 10 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> huFc-ChickenSurvivin fusion protein  
 <400> 25

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

50

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe  
 195 200 205

5 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys  
 210 215 220

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Ala Ala Ala Tyr Ala Glu Met Leu Pro  
 225 230 235 240

10 Lys Glu Trp Leu Val Tyr Leu Val Ser Thr Arg Ala Ala Thr Phe Arg  
 245 250 255

Asn Trp Pro Phe Thr Glu Gly Cys Ala Cys Thr Pro Glu Arg Met Ala  
 260 265 270

15 Ala Ala Gly Phe Val His Cys Pro Ser Glu Asn Ser Pro Asp Val Val  
 275 280 285

Gln Cys Phe Phe Cys Leu Lys Glu Leu Glu Gly Trp Glu Pro Asp Asp  
 290 295 300

20 Asp Pro Leu Glu Glu His Lys Lys His Ser Ala Gly Cys Ala Phe Ala  
 305 310 315 320

25 Ala Leu Gln Lys Asp Pro Ser Asn Leu Thr Val Gln Glu Phe Leu Lys  
 325 330 335

Leu Asp Lys Lys Arg Thr Lys Asn Val Ile Lys Lys Ala Ile Ser Gln  
 340 345 350

30 Lys Glu Thr Asp Ile Glu Asp Val Ala Lys Gly Val Arg His Ala Ile  
 355 360 365

Glu Asn Met Gly Pro  
 370

35 <210> 26  
 <211> 1125  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

40 <220>  
 <223> sequence encoding muFc-ChickenSurvivin fusion protein

<400> 26  
 gagcccagag ggcccacaat caagccctgt cctccatgca aatgcccagc acctaacctc 60  
 ttgggtggac catccgtctt catcttcctt ccaagatca aggatgtact catgatctcc 120  
 45 ctgagcccca tagtcacatg tgtggtggtg gatgtgagcg aggatgaccc agatgtccag 180  
 atcagctggt ttgtgaaca cgtggaagta cacacagctc agacacaaac ccatagagag 240  
 gattacaaca gtactctccg ggtggctcagt gccctcccca tccagcacca ggactggatg 300  
 50 agtggcaagg agttcaaag caaggtcaac aacaaagacc tcccagcgcc catcgagaga 360

accatctcaa aacccaaagg gtcagtaaga gctccacagg tatatgtctt gcctccacca 420  
 gaagaagaga tgactaagaa acaggtcact ctgacctgca tggtcacaga cttcatgcct 480  
 gaagacattt acgtggagtg gaccaacaac gggaaaacag agctaaacta caagaacact 540  
 5 gaaccagtcc tggactctga tggttcttac ttcattgtaca gcaagctgag agtggaaaag 600  
 aagaactggg tggaaagaaa tagctactcc tgttcagtgg tccacgaggg tctgcacaat 660  
 caccacacga ctaagagctt ctcccggacc ccgggtgcag cggcctatgc tgaaatgctg 720  
 10 cccaaggaat ggctggctta cctcgtctcc acccgcgccg ccaccttccg caactggccc 780  
 ttcaccgagg gctgcgcctg cacgcccgag cggatggcgg cggcgggctt cgtgactgc 840  
 cccagcgaga acagccccga cgtgggtgcag tgcttcttct gcctcaagga gctggagggc 900  
 tgggagcccg acgacgaccc gctggaggaa cacaaaaagc actccgcggg ctgcgctttt 960  
 15 gccgctcttc agaaagatcc ctctaacctg acgggtgcagg aattcttgaa gctggataaa 1020  
 aagcggacca aaaacgtaat taaaaaagca atttctcaga aggaaactga tatcgaagat 1080  
 gtagccaagg gcgtgcggca cgcgatagag aacatgggccc cttag 1125

20

<210> 27  
 <211> 374  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

25

<220>  
 <223> muFc-ChickenSurvivin fusion protein  
 <400> 27

30

Glu Pro Arg Gly Pro Thr Ile Lys Pro Cys Pro Pro Cys Lys Cys Pro  
 1 5 10 15

35

Ala Pro Asn Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys  
 20 25 30

Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Ser Pro Ile Val Thr Cys Val  
 35 40 45

Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe  
 50 55 60

40

Val Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu  
 65 70 75 80

Asp Tyr Asn Ser Thr Leu Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln His  
 85 90 95

45

Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys  
 100 105 110

50

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

Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Pro Glu Glu Glu Met  
 130 135 140  
 5 Thr Lys Lys Gln Val Thr Leu Thr Cys Met Val Thr Asp Phe Met Pro  
 145 150 155 160  
 Glu Asp Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn Asn Gly Lys Thr Glu Leu Asn  
 165 170 175  
 10 Tyr Lys Asn Thr Glu Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met  
 180 185 190  
 Tyr Ser Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn Ser  
 195 200 205  
 15 Tyr Ser Cys Ser Val Val His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Thr  
 210 215 220  
 Lys Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly Ala Ala Ala Tyr Ala Glu Met Leu  
 225 230 235 240  
 20 Pro Lys Glu Trp Leu Val Tyr Leu Val Ser Thr Arg Ala Ala Thr Phe  
 245 250 255  
 Arg Asn Trp Pro Phe Thr Glu Gly Cys Ala Cys Thr Pro Glu Arg Met  
 260 265 270  
 25 Ala Ala Ala Gly Phe Val His Cys Pro Ser Glu Asn Ser Pro Asp Val  
 275 280 285  
 Val Gln Cys Phe Phe Cys Leu Lys Glu Leu Glu Gly Trp Glu Pro Asp  
 290 295 300  
 30 Asp Asp Pro Leu Glu Glu His Lys Lys His Ser Ala Gly Cys Ala Phe  
 305 310 315 320  
 35 Ala Ala Leu Gln Lys Asp Pro Ser Asn Leu Thr Val Gln Glu Phe Leu  
 325 330 335  
 Lys Leu Asp Lys Lys Arg Thr Lys Asn Val Ile Lys Lys Ala Ile Ser  
 340 345 350  
 40 Gln Lys Glu Thr Asp Ile Glu Asp Val Ala Lys Gly Val Arg His Ala  
 355 360 365  
 45 Ile Glu Asn Met Gly Pro  
 370  
 <210> 28  
 <211> 38

50

<212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> synthetic: mutagenic sense primer Mut1s  
 5 <400> 28  
 cctctgaact gatgttgggg gagttcttga agctggat 38  
  
 <210> 29  
 <211> 35  
 10 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> synthetic: mutagenic antisense primer Mut1a  
 15 <400> 29  
 aactccccca acatcagttc agagggatct ttctg 35  
  
 <210> 30  
 <211> 41  
 <212> DNA  
 20 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> synthetic: flanking primer Pr1s  
 <400> 30  
 ccgcggccgc cccttcacc atggcggcct atgctgaaat g 41  
 25  
 <210> 31  
 <211> 34  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 30 <220>  
 <223> synthetic: flanking primer Pr1a  
 <400> 31  
 agatctggat ccctaagggc ccatgttctc tatc 34  
  
 35 <210> 32  
 <211> 30  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Chicken survivin derived peptide  
 40 <400> 32  
 Gly Cys Ala Phe Ala Ala Leu Gln Lys Asp Pro Ser Glu Leu Met Leu  
 1 5 10 15  
  
 45 Gly Glu Phe Leu Lys Leu Asp Arg Glu Arg Ala Lys Asn Val  
 20 25 30  
  
 <210> 33  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 50 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> modified Human Survivin protein fragment  
 <400> 33  
 5 Glu Pro Asp Asp Asp Pro Ile Glu Glu Ala  
 1 5 10  
  
 <210> 34  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 10 <213> Homo sapiens  
 <400> 34  
 Glu Pro Asp Asp Asp Pro Ile Glu Glu His  
 1 5 10  
 15  
 <210> 35  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 20  
 <220>  
 <223> modified Human Survivin protein fragment  
 <400> 35  
 Cys Leu Thr Glu Asn Glu Pro Asp Leu  
 1 5  
 25  
 <210> 36  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 30  
 <220>  
 <223> modified Human Survivin protein fragment  
 <400> 36  
 Ala Leu Cys Phe Phe Cys Phe Lys Glu Leu  
 1 5 10  
 35  
 <210> 37  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 40  
 <400> 37  
 Ala Gln Cys Phe Phe Cys Phe Lys Glu Leu  
 1 5 10  
 45  
 <210> 38  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 38  
 50 Glu Leu Thr Leu Gly Glu Phe Leu Lys Leu

1 5 10

5

<210> 39  
 <211> 142  
 <212> PRT  
 <213> Sus scrofa

<400> 39

10

Met Ser Ala Pro Ser Leu Pro Pro Ala Trp Gln Leu Tyr Leu Lys Asp  
 1 5 10 15

His Arg Ile Ser Thr Phe Lys Asn Trp Pro Phe Leu Glu Gly Cys Ala  
 20 25 30

15

Cys Thr Pro Glu Arg Met Ala Ala Ala Gly Phe Ile His Cys Pro Thr  
 35 40 45

Glu Asn Glu Pro Asp Leu Ala Gln Cys Phe Phe Cys Phe Lys Glu Leu  
 50 55 60

20

Glu Gly Trp Glu Pro Asp Asp Asp Pro Ile Glu Glu His Lys Lys His  
 65 70 75 80

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

25

Thr Leu Ser Glu Phe Leu Lys Leu Asp Lys Glu Arg Ala Lys Asn Lys  
 100 105 110

Ile Ala Lys Glu Thr Asn Asn Lys Gln Lys Glu Phe Glu Glu Thr Ala  
 115 120 125

30

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

35

<210> 40  
 <211> 142  
 <212> PRT  
 <213> Bos taurus

<400> 40

40

Met Ser Ala Pro Ser Leu Pro Pro Ala Trp Gln Leu Tyr Leu Lys Asp  
 1 5 10 15

His Arg Ile Ser Thr Phe Lys Asn Trp Pro Phe Leu Glu Gly Cys Ala  
 20 25 30

45

Cys Thr Pro Glu Arg Met Ala Glu Ala Gly Phe Ile His Cys Pro Thr  
 35 40 45

Glu Asn Glu Pro Asp Leu Ala Gln Cys Phe Leu Cys Phe Lys Glu Leu  
 50 55 60

50

Glu Gly Trp Glu Pro Asp Asp Asp Pro Ile Glu Glu His Lys Lys His  
 65 70 75 80  
 Ser Ser Gly Cys Ala Phe Leu Ser Val Lys Lys Gln Phe Glu Glu Leu  
 5 85 90 95  
 Thr Leu Ser Glu Phe Leu Lys Leu Asp Lys Glu Arg Ala Lys Asn Lys  
 100 105 110  
 Ile Ala Lys Glu Thr Asn Asn Lys Gln Lys Glu Phe Glu Glu Thr Ala  
 115 120 125  
 Lys Lys Val Arg Cys Ala Ile Glu Gln Leu Val Ala Met Asp  
 130 135 140  
 15  
 <210> 41  
 <211> 142  
 <212> PRT  
 <213> Felis catus  
 20  
 <400> 41  
 Met Gly Ala Ser Ser Leu Pro Pro Ala Trp Gln Leu Tyr Leu Lys Asp  
 1 5 10 15  
 His Arg Ile Ser Thr Phe Lys Asn Trp Pro Phe Leu Glu Gly Cys Ala  
 20 25  
 Cys Thr Pro Glu Arg Met Ala Glu Ala Gly Phe Ile His Cys Pro Thr  
 35 40 45  
 Glu Asn Glu Pro Asp Leu Ala Gln Cys Phe Phe Cys Phe Lys Glu Leu  
 50 55 60  
 Glu Gly Trp Glu Pro Asp Asp Asp Pro Ile Glu Glu His Lys Lys His  
 65 70 75 80  
 35  
 ser ser Gly Cys Ala Phe Leu Ser Val Lys Lys Gln Phe Glu Glu Leu  
 85 90 95  
 Thr Leu Ser Glu Phe Leu Lys Leu Asp Lys Glu Arg Ala Lys Asn Lys  
 100 105 110  
 40  
 Ile Ala Lys Glu Thr Asn His Lys Gln Lys Glu Phe Glu Glu Thr Ala  
 115 120 125  
 45  
 Lys Arg Val Arg Cys Ala Ile Glu Gln Leu Ala Ala Leu Glu  
 130 135 140  
 50  
 <210> 42  
 <211> 142  
 <212> PRT  
 <213> Rattus norvegicus

<400> 42

Met Gly Ala Thr Ala Leu Pro Pro Ile Trp Gln Met Tyr Leu Lys Asp  
 1 5 10 15  
 5 His Arg Ile Tyr Thr Phe Lys Asn Trp Pro Phe Leu Glu Asp Cys Ser  
 20  
 Cys Thr Pro Glu Arg Met Ala Glu Ala Gly Phe Ile His Cys Pro Thr  
 35 40 45  
 10 Glu Asn Glu Pro Asp Leu Ala Gln Cys Phe Phe Cys Phe Lys Glu Leu  
 50 55 60  
 15 Glu Gly Trp Glu Pro Asp Asp Asn Pro Ile Glu Glu His Arg Lys His  
 65 70 75 80  
 Ser Pro Gly Cys Ala Phe Leu Thr Val Lys Lys Gln Val Glu Glu Leu  
 85 90 95  
 20 Thr Val Ser Glu Phe Leu Lys Leu Asp Lys Gln Arg Ala Lys Asn Lys  
 100 105 110  
 Ile Ala Lys Glu Thr Asn Asn Lys Gln Lys Glu Phe Glu Glu Thr Arg  
 115 120 125  
 25 Arg Thr Val Arg Gln Ser Ile Glu Gln Leu Ala Ala Leu Arg  
 130 135 140

<210> 43  
 <211> 142  
 <212> PRT  
 <213> Pongo pygmaeus

<400> 43

Met Gly Ala Pro Thr Leu Pro Pro Ala Trp Gln Pro Phe Leu Lys Asp  
 1 5 10 15  
 35 His Arg Ile Ser Thr Phe Lys Asn Trp Pro Phe Leu Glu Gly Cys Ala  
 20 30  
 40 Cys Thr Pro Glu Arg Met Ala Glu Ala Gly Phe Ile His Cys Pro Thr  
 35 40 45  
 Glu Asn Glu Pro Asp Leu Ala Gln Cys Phe Phe Cys Phe Lys Glu Leu  
 50 55 60  
 45 Glu Gly Trp Glu Pro Asp Asp Asp Pro Ile Glu Glu His Lys Lys His  
 65 70 75 80  
 Ser Ser Gly Cys Ala Phe Leu Ser Val Lys Lys Gln Phe Glu Glu Leu  
 85 90 95  
 50

Thr Leu Gly Glu Phe Leu Lys Leu Asp Arg Glu Arg Ala Lys Asn Lys  
 100 105 110  
 5  
 Ile Ala Lys Glu Thr Asn Asn Lys Lys Lys Glu Phe Glu Glu Thr Ala  
 115 120 125  
 Lys Lys Val Arg Arg Ala Ile Glu Gln Leu Ala Ala Met Asp  
 130 135 140  
 10  
 <210> 44  
 <211> 135  
 <212> PRT  
 <213> Gallus gallus  
 <400> 44  
 15  
 Met Ala Ala Tyr Ala Glu Met Leu Pro Lys Glu Trp Leu Val Tyr Leu  
 1 5 10  
 Val Ser Thr Arg Ala Ala Thr Phe Arg Asn Trp Pro Phe Thr Glu Gly  
 20 25 30  
 20  
 Cys Ala Cys Thr Pro Glu Arg Met Ala Ala Ala Gly Phe Val His Cys  
 35 40 45  
 25  
 Pro Ser Glu Asn Ser Pro Asp Val Val Gln Cys Phe Phe Cys Leu Lys  
 50 55 60  
 Glu Leu Glu Gly Trp Glu Pro Asp Asp Asp Pro Leu Glu Glu His Lys  
 65 70 75 80  
 30  
 Lys His Ser Ala Gly Cys Ala Phe Ala Ala Leu Gln Lys Asp Pro Ser  
 85 90 95  
 Asn Leu Thr Val Gln Glu Phe Leu Lys Leu Asp Lys Lys Arg Thr Lys  
 100 105 110  
 35  
 Asn Val Ile Val Arg Thr Pro Arg Gln Arg Gly Gly Ala Pro Cys Pro  
 115 120 125  
 40  
 Ala Leu Leu Pro Ala Leu Ala  
 130 135  
 40  
 <210> 45  
 <211> 59  
 <212> PRT  
 <213> Gallus gallus  
 45  
 <400> 45  
 Met Ala Ala Tyr Ala Glu Met Leu Pro Lys Glu Trp Leu Val Tyr Leu  
 1 5 10 15  
 50

Val Ser Thr Arg Ala Ala Thr Phe Arg Asn Trp Pro Phe Thr Glu Gly  
 20 25 30

5 Cys Ala Cys Thr Pro Glu Arg Gly Gly Thr Gln Lys Ala Leu Arg Gly  
 35 40 45

Leu Arg Phe Cys Arg Ser Ser Glu Arg Ser Leu  
 50 55

10 <210> 46  
 <211> 160  
 <212> PRT  
 <213> Xenopus laevis  
 <400> 46

15 Met Tyr Ser Ala Lys Asn Arg Phe Val Gln Ala Val Gln Arg Leu Gln  
 1 5 10 15

Asp Phe Lys Asn Met Tyr Asp Tyr Asp Ala Arg Leu Ala Thr Phe Ala  
 20 25 30

20 Asp Trp Pro Phe Thr Glu Asn Cys Lys Cys Thr Pro Glu Ser Met Ala  
 35 40 45

25 Lys Ala Gly Phe Val His Cys Pro Thr Glu Asn Glu Pro Asp Val Ala  
 50 55 60

Cys Cys Phe Phe Cys Leu Lys Glu Leu Glu Gly Trp Glu Pro Asp Asp  
 65 70 75 80

30 Asp Pro Trp Thr Glu His Ser Lys Arg Ser Ala Asn Cys Gly Phe Leu  
 85 90 95

Ser Leu Thr Lys Cys Val Asn Asp Leu Thr Met Glu Gly Phe Leu Arg  
 100 105 110

35 Leu Glu Gly Asp Arg Ile Lys Ser Phe Tyr Arg Lys Phe Ser Thr Val  
 115 120 125

Val Leu Gln Tyr Val Glu Glu Glu Met Thr Ala Ala Thr Lys Arg Leu  
 130 135 140

40 Leu Glu Tyr Phe Ser Asn Gln His Gln Cys Ser Ile Asp Leu Asp His  
 145 150 155 160

45 <210> 47  
 <211> 156  
 <212> PRT  
 <213> xenopus laevis  
 <400> 47

50 Met Ser Ser Cys Ser Ile Val Ser Leu Leu Pro Gly Asp Lys Glu Pro  
 1 5 10 15

Ser Met Pro Asp Glu Trp Arg Leu Tyr Lys Leu Ala Thr Arg Leu Arg  
 20 25 30  
 Thr Phe Ser Asn Trp Pro Phe Thr Glu Asp Cys Ala Cys Thr Pro Glu  
 5 35 40 45  
 Arg Met Ala Glu Ala Gly Phe Val His Cys Pro Ser Asp Asn Ser Pro  
 50 55 60  
 Asp Val Val Lys Cys Phe Phe Cys Leu Lys Glu Leu Glu Gly Trp Gln  
 10 65 70 75 80  
 Pro Glu Asp Asp Pro Met Asp Glu His Lys Lys His Ser Pro Ser Cys  
 15 85 90 95  
 Leu Phe Ile Ala Leu Lys Lys Lys Ala Glu Glu Leu Thr Leu Ser Glu  
 100 105  
 Phe Leu Lys Leu Asp Leu Glu Arg Thr Lys Ile Lys Met Gln Lys Gln  
 20 115 120 125  
 Met Asn Leu Arg Ile Glu Cys Phe Gln Ala Lys Ala Asn Glu Val Arg  
 130 135 140  
 Gly His Leu Glu Gln Leu Asp Ala Asp Glu Thr Gln  
 25 145 150 155  
 <210> 48  
 <211> 142  
 <212> PRT  
 <213> Danio rerio  
 30  
 <400> 48  
 Met Asp Leu Ala Ser Asp Asp Gln Thr Lys Met Tyr Phe Tyr Glu Asn  
 1 5 10 15  
 Arg Leu Gln Thr Phe Val Gly Trp Pro Phe Glu Glu Gly Cys Val Cys  
 20 25 30  
 Thr Pro Glu Asn Met Ala Lys Ala Gly Phe Ile His Thr Pro Ser Glu  
 35 35 40 45  
 Asn Ser Pro Asp Ile Ala Gln Cys Phe Phe Cys Leu Lys Glu Leu Glu  
 50 55 60  
 Gly Trp Glu Pro Glu Asp Asp Pro Glu Lys Glu His Lys Ala His Ser  
 45 65 70 75 80  
 Pro Ser Cys Asp Phe Ile Leu Leu Lys Lys Thr Val Asp Ser Leu Thr  
 85 90 95

50

val Glu Glu Phe Leu Lys Leu Gln Lys Glu Arg Gln Lys Phe Ile Ile  
 100 105 110  
 5 Lys Lys Ser Cys Gly His Ala Ile Asp Lys Phe Glu Asp Ala Val Lys  
 115 120 125  
 Leu Lys Arg Asn Gln Ile Ile Gln Thr Ala Met Gly Glu Glu  
 130 135 140  
 10 <210> 49  
 <211> 128  
 <212> PRT  
 <213> Danio rerio  
 <400> 49  
 15 Met Tyr Ser Tyr Glu Lys Arg Leu Gln Thr Phe Ser Glu Trp Pro Phe  
 1 5 10  
 Arg Glu Asp Cys Gln Cys Thr Pro Glu Leu Met Ala Lys Ala Gly Phe  
 20 20 25 30  
 20 val His Cys Pro Ser Glu Asn Glu Pro Asp Val Ala Cys Cys Phe Tyr  
 35 40 45  
 25 Cys Leu Arg Glu Leu Glu Gly Trp Glu Pro Asp Asp Asn Pro Trp Ser  
 50 55 60  
 Glu His Ala Lys Arg Ser Pro Asn Cys Ala Phe Leu His Met Ser Lys  
 65 70 75 80  
 30 Thr Phe Asp Glu Leu Thr Ala Ile Glu Tyr Phe His Leu Glu Gln Glu  
 85 90 95  
 Arg Leu Arg Ile Tyr Ile Lys Lys Met Gly His Arg Lys Ile Ala Tyr  
 100 105 110  
 35 Phe Arg Asp Glu Val Glu Ala Thr Ser Lys Asn Leu Arg Ala Leu Ile  
 115 120 125  
 40 <210> 50  
 <211> 110  
 <212> PRT  
 <213> Tetraodon nigroviridis  
 <400> 50  
 45 Met Asn Pro Tyr Asn Asp Gln His Leu Lys Met Tyr Phe Tyr Glu Asn  
 1 5 10  
 Arg Leu Lys Thr Phe Glu Gly Trp Pro Phe Glu Glu Asp Cys Leu Cys  
 20 25 30  
 50 Thr Pro Glu Asn Met Ala Lys Ala Gly Phe Val His Thr Pro Ser Glu



Leu Ala Ser Tyr Ser Gly Trp Pro Phe Asp Glu Asp Cys Ala Cys Thr  
 20 25 30

5 Ser Asp Asn Met Ala Lys Ala Gly Phe Ile His Lys Pro Thr Glu Asn  
 35 40 45

Ser Pro Asp Val Ala Gln Cys Phe Phe Cys Phe Lys Glu Leu Glu Gly  
 50 55 60

10 Trp Glu Pro Glu Asp Asp Pro Leu Lys Glu His Lys Ser His Ser Pro  
 65 70 75 80

Thr Cys Asn Phe Ile Leu Leu Lys Lys Pro Val Glu Glu Leu Thr Val  
 85 90 95

15 Glu Glu Ile Leu Lys Leu Gln Lys Glu Arg Gln Lys Phe His Ile Lys  
 100 105 110

Met Ala Cys Arg Gln Val Ile Glu Lys Phe Glu Glu Ala Ala Lys Ser  
 115 120 125

20 Arg Arg Gly Asp Ile Ile Lys Leu Ala Met Glu Gly  
 130 135 140

25 <210> 53  
 <211> 72  
 <212> PRT  
 <213> Drosophila melanogaster  
 <400> 53

30 Gln His Arg Val Glu Ser Tyr Lys Ser Trp Pro Phe Pro Glu Thr Ala  
 1 5 10 15

Ser Cys Ser Ile Ser Lys Met Ala Glu Ala Gly Phe Tyr Trp Thr Gly  
 20 25 30

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

Leu Asp Gly Trp Glu Pro Glu Asp Asp Pro Trp Lys Glu His Val Lys  
 50 55 60

40 His Ala Pro Gln Cys Glu Phe Ala  
 65 70

45 <210> 54  
 <211> 68  
 <212> PRT  
 <213> Caenorhabditis elegans  
 <400> 54

50 Asp Arg Leu Met Thr Phe Lys Asn Phe Glu Tyr Asp Arg Asp Pro Asp



<210> 56  
 <211> 142  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

5 <220>  
 <223> HumanSurvivin(R18E, P47L, Q56L, H77A, C84A, A128P, I135P)  
 <400> 56

Met Gly Ala Pro Thr Leu Pro Pro Ala Trp Gln Pro Phe Leu Lys Asp  
 1 5 10 15  
 His Glu Ile Ser Thr Phe Lys Asn Trp Pro Phe Leu Glu Gly Cys Ala  
 20 25 30  
 Cys Thr Pro Glu Arg Met Ala Glu Ala Gly Phe Ile His Cys Leu Thr  
 35 40 45  
 Glu Asn Glu Pro Asp Leu Ala Leu Cys Phe Phe Cys Phe Lys Glu Leu  
 50 55 60  
 Glu Gly Trp Glu Pro Asp Asp Asp Pro Ile Glu Glu Ala Lys Lys His  
 65 70 75 80  
 Ser Ser Gly Ala Ala Phe Leu Ser Val Lys Lys Gln Phe Glu Glu Leu  
 85 90 95  
 Thr Leu Gly Glu Phe Leu Lys Leu Asp Arg Glu Arg Ala Lys Asn Lys  
 100 105 110  
 Ile Ala Lys Glu Thr Asn Asn Lys Lys Lys Glu Phe Glu Glu Thr Pro  
 115 120 125  
 Lys Lys Val Arg Arg Ala Pro Glu Gln Leu Ala Ala Met Asp  
 130 135 140

35 <210> 57  
 <211> 429  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<400> 57  
 atgggtgccc cgacgttgcc ccctgcctgg cagccctttc tcaaggacca ccgcatctct 60  
 40 acattcaaga actggccctt cttggagggc tgcgcctgca ccccgagcg gatggccgag 120  
 gctggcttca tccactgccc cactgagaac gagccagact tggcccagtg tttcttctgc 180  
 ttcaaggagc tggaaggctg ggagccagat gacgacccca tagaggaaca taaaaagcat 240  
 45 tcgtccggtt gcgctttcct ttctgtcaag aagcagtttg aagaattaac ccttggtgaa 300  
 tttttgaaac tggacagaga aagagccaag aacaaaattg caaaggaaac caacaataag 360  
 aagaaagaat ttgaggaaac tgcggagaaa gtgcgccgtg ccatcgagca gctggctgcc 420  
 50 atggattga 429

<210> 58  
 <211> 474  
 <212> DNA  
 <213> Xenopus laevis

5 <400> 58  
 atgttgagta tttctccgat tgtttctcta cgtcgctgtg ataatgagcc gtctatgccc 60  
 gacgaatggc gcctgtataa cttggctacg cgcctcagga ctttctctaa ctggcccttt 120  
 actgaagact gcgcttgtag cccagagcgg atggcagagg ctggatttgt tcaactgcccc 180  
 10 actgacaaca gtccagatgt ggtaagtgt ttcttctgtc tcaaagaact agaaggttgg 240  
 cagcctgagg atgaccctat ggatgaacac aagaaacatt caccaagctg cttattcatc 300  
 gcattgaaaa agaaagcaga ggaactgaca ctaagcgagt tcctgaaact ggacttggag 360  
 15 catacgaaaa tcaagatgca aaagcagatg aacctgcaca ttgaaagggt ccaggcaaaa 420  
 gcaaatgagg tgcgggggtca cttggagaaa cttgatgctg acgaaacaca gtga 474

<210> 59  
 <211> 483  
 <212> DNA  
 <213> Xenopus laevis

20 <400> 59  
 atgtactctg ccaagaacag gtttgtgcaa gcagtgaac gcctgcagga ttttaagaat 60  
 atgtatgatt atgacgcccg ctttgaaca ttcgcagact ggccctttac tgaaaactgc 120  
 25 aagtgcaccc cagaaagtat ggctaaagct ggctttgttc actgccccac tgagaatgaa 180  
 cccgatgttg cttgctgttt tttctgcttg aaggagctgg agggctggga gccagatgat 240  
 gacccttggga ctgaacattc caagcgttct gccaaactgtg gtttcctctc cctgacaaaag 300  
 30 tgtgtcaatg acctcacaat ggaggggttt ctgcggttg aaggatgatc gatcaagagt 360  
 ttctatcgca agttttctac tgtcgttctc cagtacgtcg aggaagaaat gactgcagct 420  
 acaaagcgcc tgctggaata cttctccaac caacaccatt gctccataga tcttgaccac 480  
 tga 483

<210> 60  
 <211> 429  
 <212> DNA  
 <213> Danio rerio

35 <400> 60  
 atggatcttg caagtgatga tcagaccaa atgtactttt acgagaatag acttcaaaca 60  
 ttcgtcgggt ggccgtttga agagggtgc gtttgcactc cagaaacat ggctaaagct 120  
 ggatttattc acaccccgtc ggagaacagt ccagatatag cgcagtgttt cttctgtctg 180  
 45 aaagagctgg aaggatggga accggaggat gaccctgaga aagagcataa agcgcattct 240  
 cccagctgtg attttatctt gctgaagaag acagtggaca gtctgactgt ggaggaatth 300  
 ctaaaacttc agaaagagag acagaagttt attattaa aatcatgtgg ccacgcgatt 360

50

gataaatttg aagacgcagt gaagctcaag agaaaccaga tcatccagac tgcgatggga 420  
gaggaatga 429

5 <210> 61  
<211> 423  
<212> DNA  
<213> Ictalurus punctatus

<400> 61  
10 atggagctta tgaacgaaga tttaaaaatg tactttttacg agaacagatt agctttcttat 60  
tcagggtggc cgtttgatga ggactgcgcc tgcacgtcgg ataatatggc caaagctggt 120  
ttcatccaca aaccactga aacagctccg gatgtggccc agtgcttctt ctgctttaa 180  
gagctggagg gttgggagcc tgaggatgat cctctcaagg aacacaagtc tcaactctcca 240  
15 acttgcaatt tcattctgct gaaaaagcca gtggaggagc tcacagtgga ggagattctg 300  
aagctgcaga aagagaggca aaagttccac attaaaatgg cctgcagaca agtaattgag 360  
aagtttgagg aagcagcaaa atcgagaaga ggtgacatta tcaaactagc catggaaggc 420  
tga 423

20 <210> 62  
<211> 429  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

25 <220>  
<223> sequence encoding ChickenSurvivin(N97E, T99M, V100L, Q101G)

<400> 62  
30 atggcggcct atgctgaaat gctgccaag gaatggctgg tctacctcgt ctccacccgc 60  
gccgccacct tccgcaactg gcccttcacc gagggtgctg cctgcacgcc cgagcggatg 120  
gcggcggcgg gcttcgtgca ctgccccagc gagaacagcc ccgacgtggt gcagtgttc 180  
ttctgcctca aggagctgga gggctgggag cccgacgacg acccgctgga ggaacacaaa 240  
aagcactccg cgggctgctg ttttgccgct cttcagaaag atccctctga actgatgttg 300  
35 ggggagtctt tgaagctgga taaaagcgg accaaaaacg taattaaana agcaatttct 360  
cagaaggaaa ctgatatcga agatgtagcc aagggcgtgc ggcacgcgat agagaacatg 420  
ggcccttag 429

40 <210> 63  
<211> 72  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 63  
45 Asp His Arg Ile Ser Thr Phe Lys Asn Trp Pro Phe Leu Glu Gly Cys  
1 5 10 15

Ala Cys Thr Pro Glu Arg Met Ala Glu Ala Gly Phe Ile His Cys Pro  
20 25 30

50

Thr Glu Asn Glu Pro Asp Leu Ala Gln Cys Phe Phe Cys Phe Lys Glu  
 35 40 45

5 Leu Glu Gly Trp Glu Pro Asp Asp Asp Pro Ile Glu Glu His Lys Lys  
 50 55 60

His Ser Ser Gly Cys Ala Phe Leu  
 65 70

10 <210> 64  
 <211> 142  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

15 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <223> GenBank accession number NM\_001168.2  
 <400> 64

20 Met Gly Ala Pro Thr Leu Pro Pro Ala Trp Gln Pro Phe Leu Lys Asp  
 1 5 10 15

His Arg Ile Ser Thr Phe Lys Asn Trp Pro Phe Leu Glu Gly Cys Ala  
 20 25 30

25 Cys Thr Pro Glu Arg Met Ala Glu Ala Gly Phe Ile His Cys Pro Thr  
 35 40 45

Glu Asn Glu Pro Asp Leu Ala Gln Cys Phe Phe Cys Phe Lys Glu Leu  
 50 55 60

30 Glu Gly Trp Glu Pro Asp Asp Asp Pro Ile Glu Glu His Lys Lys His  
 65 70 75 80

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

35 Thr Leu Gly Glu Phe Leu Lys Leu Asp Arg Glu Arg Ala Lys Asn Lys  
 100 105 110

40 Ile Ala Lys Glu Thr Asn Asn Lys Lys Lys Glu Phe Glu Glu Thr Ala  
 115 120 125

Glu Lys Val Arg Arg Ala Ile Glu Gln Leu Ala Ala Met Asp  
 130 135 140

45 <210> 65  
 <211> 142  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

50 <220>

<221> misc\_feature  
 <223> GenBank accession number O15392

<400> 65

5 Met Gly Ala Pro Thr Leu Pro Pro Ala Trp Gln Pro Phe Leu Lys Asp  
 1 5 10 15  
 His Arg Ile Ser Thr Phe Lys Asn Trp Pro Phe Leu Glu Gly Cys Ala  
 20 25 30  
 10 Cys Thr Pro Glu Arg Met Ala Glu Ala Gly Phe Ile His Cys Pro Thr  
 35 40 45  
 15 Glu Asn Glu Pro Asp Leu Ala Gln Cys Phe Phe Cys Phe Lys Glu Leu  
 50 55 60  
 Glu Gly Trp Glu Pro Asp Asp Asp Pro Ile Glu Glu His Lys Lys His  
 65 70 75 80  
 20 Ser Ser Gly Cys Ala Phe Leu Ser Val Lys Lys Gln Phe Glu Glu Leu  
 85 90 95  
 Thr Leu Gly Glu Phe Leu Lys Leu Asp Arg Glu Arg Ala Lys Asn Lys  
 100 105 110  
 25 Ile Ala Lys Glu Thr Asn Asn Lys Lys Lys Glu Phe Glu Glu Thr Ala  
 115 120 125  
 Lys Lys Val Arg Arg Ala Ile Glu Gln Leu Ala Ala Met Asp  
 130 135 140

30

<210> 66  
 <211> 142  
 <212> PRT  
 <213> Canis familiaris

35

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <223> GenBank accession number NP\_001003019.1

<400> 66

40 Met Gly Ala Pro Thr Leu Pro Pro Ala Trp Gln Pro Phe Leu Lys Asp  
 1 5 10 15  
 His Arg Ile Ser Thr Phe Lys Asn Trp Pro Phe Leu Glu Gly Cys Ala  
 20 25 30  
 45 Cys Thr Pro Asp Arg Met Ala Glu Ala Gly Phe Ile His Cys Pro Thr  
 35 40 45  
 50 Glu Asn Glu Pro Asp Leu Ala Gln Cys Phe Phe Cys Phe Lys Glu Leu  
 50 55 60

50

Glu Gly Trp Glu Pro Asp Asp Asp Pro Ile Glu Glu His Lys Lys His  
 65 70 75 80  
 5 Ser Ser Gly Cys Ala Phe Leu Ser Val Lys Lys Gln Phe Glu Glu Leu  
 85 90 95  
 Thr Leu Gly Glu Phe Leu Lys Leu Asp Arg Glu Arg Ala Lys Asn Lys  
 100 105 110  
 10 Ile Ala Lys Glu Thr Asn Asn Lys Lys Lys Glu Phe Glu Glu Thr Ala  
 115 120 125  
 Lys Lys Val Arg Arg Ala Ile Glu Gln Leu Ala Ala Met Asp  
 130 135 140  
 15  
 <210> 67  
 <211> 142  
 <212> PRT  
 <213> Sus scrofa  
 20  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <223> GenBank accession number NP\_999306.1  
 <400> 67  
 25 Met Ser Ala Pro Ser Leu Pro Pro Ala Trp Gln Leu Tyr Leu Lys Asp  
 1 5 10 15  
 His Arg Ile Ser Thr Phe Lys Asn Trp Pro Phe Leu Glu Gly Cys Ala  
 20 25 30  
 30 Cys Thr Pro Glu Arg Met Ala Ala Ala Gly Phe Ile His Cys Pro Thr  
 35 40 45  
 Glu Asn Glu Pro Asp Leu Ala Gln Cys Phe Phe Cys Phe Lys Glu Leu  
 50 55 60  
 35 Glu Gly Trp Glu Pro Asp Asp Asp Pro Ile Glu Glu His Lys Lys His  
 65 70 75 80  
 40 Ser Ser Gly Cys Ala Phe Leu Ser Val Lys Lys Gln Phe Glu Glu Leu  
 85 90 95  
 Thr Leu Ser Glu Phe Leu Lys Leu Asp Lys Glu Arg Ala Lys Asn Lys  
 100 105 110  
 45 Ile Ala Lys Glu Thr Asn Asn Lys Gln Lys Glu Phe Glu Glu Thr Ala  
 115 120 125  
 Lys Lys Val Arg Cys Ala Ile Glu Gln Leu Ala Ala Ser Glu  
 130 135 140  
 50

<210> 68  
 <211> 142  
 <212> PRT  
 <213> Bos taurus

5

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <223> GenBank accession number NP\_001001855.2  
 <400> 68

10

Met Gly Ala Gln Ser Leu Pro Pro Ala Trp Gln Leu Tyr Leu Lys Asp  
 1 5 10 15

His Arg Val Ser Thr Phe Lys Asn Trp Pro Phe Leu Glu Gly Cys Ala  
 20 25 30

15

Cys Thr Pro Glu Arg Met Ala Ala Ala Gly Phe Ile His Cys Pro Thr  
 35 40 45

20

Glu Asn Glu Pro Asp Leu Ala Gln Cys Phe Phe Cys Phe Lys Glu Leu  
 50 55 60

Glu Gly Trp Glu Pro Asp Asp Asp Pro Ile Glu Glu His Lys Lys His  
 65 70 75 80

25

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

Thr Leu Ser Glu Phe Leu Lys Leu Asp Lys Glu Arg Thr Lys Asn Lys  
 100 105 110

30

Ile Ala Lys Glu Thr Asn Asn Lys Gln Lys Glu Phe Glu Glu Thr Ala  
 115 120 125

Lys Lys Val Arg Cys Ala Ile Glu Gln Leu Ala Ala Leu Glu  
 130 135 140

35

<210> 69  
 <211> 142  
 <212> PRT  
 <213> Felis catus

40

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <223> GenBank accession number NP\_001009280.1  
 <400> 69

45

Met Gly Ala Ser Ser Leu Pro Pro Ala Trp Gln Leu Tyr Leu Lys Asp  
 1 5 10 15

His Arg Ile Ser Thr Phe Lys Asn Trp Pro Phe Leu Glu Gly Cys Ala  
 20 25 30

50

Cys Thr Pro Glu Arg Met Ala Glu Ala Gly Phe Ile His Cys Pro Thr  
 35 40 45  
 5  
 Glu Asn Glu Pro Asp Leu Ala Gln Cys Phe Phe Cys Phe Lys Glu Leu  
 50 55 60  
 Glu Gly Trp Glu Pro Asp Asp Asp Pro Ile Glu Glu His Lys Lys His  
 65 70 75 80  
 10  
 Ser Ser Gly Cys Ala Phe Leu Ser Val Lys Lys Gln Phe Glu Glu Leu  
 85 90 95  
 Thr Leu Ser Glu Phe Leu Lys Leu Asp Lys Glu Arg Ala Lys Asn Lys  
 100 105 110  
 15  
 Ile Ala Lys Glu Thr Asn His Lys Gln Lys Glu Phe Glu Glu Thr Ala  
 115 120 125  
 Lys Arg Val Arg Cys Ala Ile Glu Gln Leu Ala Ala Leu Glu  
 130 135 140  
 20  
 <210> 70  
 <211> 140  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 25  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <223> GenBank accession number NP\_033819.1  
 <400> 70  
 30  
 Met Gly Ala Pro Ala Leu Pro Gln Ile Trp Gln Leu Tyr Leu Lys Asn  
 1 5 10 15  
 Tyr Arg Ile Ala Thr Phe Lys Asn Trp Pro Phe Leu Glu Asp Cys Ala  
 20 25 30  
 35  
 Cys Thr Pro Glu Arg Met Ala Glu Ala Gly Phe Ile His Cys Pro Thr  
 35 40 45  
 Glu Asn Glu Pro Asp Leu Ala Gln Cys Phe Phe Cys Phe Lys Glu Leu  
 50 55 60  
 40  
 Glu Gly Trp Glu Pro Asp Asp Asn Pro Ile Glu Glu His Arg Lys His  
 65 70 75 80  
 45  
 Ser Pro Gly Cys Ala Phe Leu Thr Val Lys Lys Gln Met Glu Glu Leu  
 85 90 95  
 Thr Val Ser Glu Phe Leu Lys Leu Asp Arg Gln Arg Ala Lys Asn Lys  
 100 105 110  
 50

Ile Ala Lys Glu Thr Asn Asn Lys Gln Lys Glu Phe Glu Glu Thr Ala  
 115 120 125

5

Lys Thr Thr Arg Gln Ser Ile Glu Gln Leu Ala Ala  
 130 135 140

<210> 71  
 <211> 142  
 <212> PRT  
 <213> Rattus norvegicus

10

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <223> GenBank accession number AAF82586.1

15

<400> 71  
 Met Gly Ala Thr Ala Leu Pro Pro Ile Trp Gln Met Tyr Leu Lys Asp  
 1 5 10 15

20

His Arg Ile Tyr Thr Phe Lys Asn Trp Pro Phe Leu Glu Asp Cys Ser  
 20 25 30

Cys Thr Pro Glu Arg Met Ala Glu Ala Gly Phe Ile His Cys Pro Thr  
 35 40 45

25

Glu Asn Glu Pro Asp Leu Ala Gln Cys Phe Phe Cys Phe Lys Glu Leu  
 50 55 60

Glu Gly Trp Glu Pro Asp Asp Asn Pro Ile Glu Glu His Arg Lys His  
 65 70 75 80

30

Ser Pro Gly Cys Ala Phe Leu Thr Val Lys Lys Gln Val Glu Glu Leu  
 85 90 95

Thr Val Ser Glu Phe Leu Lys Leu Asp Lys Gln Arg Ala Lys Asn Lys  
 100 105 110

35

Ile Ala Lys Glu Thr Asn Asn Lys Gln Lys Glu Phe Glu Glu Thr Arg  
 115 120 125

Arg Thr Val Arg Gln Ser Ile Glu Gln Leu Ala Ala Leu Arg  
 130 135 140

40

<210> 72  
 <211> 142  
 <212> PRT  
 <213> Pongo pygmaeus

45

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <223> GenBank accession number CAH91231.1

<400> 72

50

Met Gly Ala Pro Thr Leu Pro Pro Ala Trp Gln Pro Phe Leu Lys Asp  
 1 5 10 15  
 His Arg Ile Ser Thr Phe Lys Asn Trp Pro Phe Leu Glu Gly Cys Ala  
 5 20 25 30  
 Cys Thr Pro Glu Arg Met Ala Glu Ala Gly Phe Ile His Cys Pro Thr  
 35 40 45  
 Glu Asn Glu Pro Asp Leu Ala Gln Cys Phe Phe Cys Phe Lys Glu Leu  
 10 50 55 60  
 Glu Gly Trp Glu Pro Asp Asp Asp Pro Ile Glu Glu His Lys Lys His  
 65 70 75 80  
 Ser Ser Gly Cys Ala Phe Leu Ser Val Lys Lys Gln Phe Glu Glu Leu  
 15 85 90 95  
 Thr Leu Gly Glu Phe Leu Lys Leu Asp Arg Glu Arg Ala Lys Asn Lys  
 20 100 105 110  
 Ile Ala Lys Glu Thr Asn Asn Lys Lys Lys Glu Phe Glu Glu Thr Ala  
 115 120 125  
 Lys Lys Val Arg Arg Ala Ile Glu Gln Leu Ala Ala Met Asp  
 25 130 135 140  
 <210> 73  
 <211> 142  
 <212> PRT  
 <213> Gallus gallus  
 30  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <223> GenBank accession number NP\_001012318.1  
 35  
 <400> 73  
 Met Ala Ala Tyr Ala Glu Met Leu Pro Lys Glu Trp Leu Val Tyr Leu  
 1 5 10 15  
 Val Ser Thr Arg Ala Ala Thr Phe Arg Asn Trp Pro Phe Thr Glu Gly  
 40 20 25 30  
 Cys Ala Cys Thr Pro Glu Arg Met Ala Ala Ala Gly Phe Val His Cys  
 35 40 45  
 Pro Ser Glu Asn Ser Pro Asp Val Val Gln Cys Phe Phe Cys Leu Lys  
 45 50 55 60  
 Glu Leu Glu Gly Trp Glu Pro Asp Asp Asp Pro Leu Glu Glu His Lys  
 65 70 75 80  
 50

Lys His Ser Ala Gly Cys Ala Phe Ala Ala Leu Gln Lys Asp Pro Ser  
 85 90 95  
 5 Asn Leu Thr Val Gln Glu Phe Leu Lys Leu Asp Lys Lys Arg Thr Lys  
 100 105 110  
 Asn Val Ile Lys Lys Ala Ile Ser Gln Lys Glu Thr Asp Ile Glu Asp  
 115 120 125  
 10 Val Ala Lys Gly Val Arg His Ala Ile Glu Asn Met Gly Pro  
 130 135 140  
 <210> 74  
 <211> 157  
 <212> PRT  
 15 <213> xenopus laevis  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <223> GenBank accession number AAO20085.1  
 20 <400> 74  
 Met Leu Ser Ile Ser Pro Ile Val Ser Leu Arg Arg Cys Asp Asn Glu  
 1 5 10  
 25 Pro Ser Met Pro Asp Glu Trp Arg Leu Tyr Asn Leu Ala Thr Arg Leu  
 20 25 30  
 Arg Thr Phe Ser Asn Trp Pro Phe Thr Glu Asp Cys Ala Cys Thr Pro  
 35 40 45  
 30 Glu Arg Met Ala Glu Ala Gly Phe Val His Cys Pro Thr Asp Asn Ser  
 50 55 60  
 Pro Asp Val Val Lys Cys Phe Phe Cys Leu Lys Glu Leu Glu Gly Trp  
 65 70 75 80  
 35 Gln Pro Glu Asp Asp Pro Met Asp Glu His Lys Lys His Ser Pro Ser  
 85 90 95  
 40 Cys Leu Phe Ile Ala Leu Lys Lys Lys Ala Glu Glu Leu Thr Leu Ser  
 100 105 110  
 Glu Phe Leu Lys Leu Asp Leu Glu His Thr Lys Ile Lys Met Gln Lys  
 115 120 125  
 45 Gln Met Asn Leu His Ile Glu Arg Phe Gln Ala Lys Ala Asn Glu Val  
 130 135 140  
 Arg Gly His Leu Glu Lys Leu Asp Ala Asp Glu Thr Gln  
 145 150 155  
 50

<210> 75  
 <211> 160  
 <212> PRT  
 <213> Xenopus laevis

5

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <223> GenBank accession number AAM76714.1

<400> 75

10

Met Tyr Ser Ala Lys Asn Arg Phe Val Gln Ala Val Gln Arg Leu Gln  
 1 5 10 15

Asp Phe Lys Asn Met Tyr Asp Tyr Asp Ala Arg Leu Ala Thr Phe Ala  
 20 25 30

15

Asp Trp Pro Phe Thr Glu Asn Cys Lys Cys Thr Pro Glu Ser Met Ala  
 35 40 45

Lys Ala Gly Phe Val His Cys Pro Thr Glu Asn Glu Pro Asp Val Ala  
 50 55 60

20

Cys Cys Phe Phe Cys Leu Lys Glu Leu Glu Gly Trp Glu Pro Asp Asp  
 65 70 75 80

25

Asp Pro Trp Thr Glu His Ser Lys Arg Ser Ala Asn Cys Gly Phe Leu  
 85 90 95

Ser Leu Thr Lys Cys Val Asn Asp Leu Thr Met Glu Gly Phe Leu Arg  
 100 105 110

30

Leu Glu Gly Asp Arg Ile Lys Ser Phe Tyr Arg Lys Phe Ser Thr Val  
 115 120 125

Val Leu Gln Tyr Val Glu Glu Glu Met Thr Ala Ala Thr Lys Arg Leu  
 130 135 140

35

Leu Glu Tyr Phe Ser Asn Gln His Gln Cys Ser Ile Asp Leu Asp His  
 145 150 155 160

40

<210> 76  
 <211> 156  
 <212> PRT  
 <213> Xenopus laevis

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <223> GenBank accession number AAH89271.1

<400> 76

45

Met Ser Ser Cys Ser Ile Val Ser Leu Leu Pro Gly Asp Lys Glu Pro  
 1 5 10 15

50

Ser Met Pro Asp Glu Trp Arg Leu Tyr Lys Leu Ala Thr Arg Leu Arg  
 20 25 30

5 Thr Phe Ser Asn Trp Pro Phe Thr Glu Asp Cys Ala Cys Thr Pro Glu  
 35 40 45

Arg Met Ala Glu Ala Gly Phe Val His Cys Pro Ser Asp Asn Ser Pro  
 50 55 60

10 Asp Val Val Lys Cys Phe Phe Cys Leu Lys Glu Leu Glu Gly Trp Gln  
 65 70 75 80

Pro Glu Asp Asp Pro Met Asp Glu His Lys Lys His Ser Pro Ser Cys  
 85 90 95

15 Leu Phe Ile Ala Leu Lys Lys Lys Ala Glu Glu Leu Thr Leu Ser Glu  
 100 105 110

Phe Leu Lys Leu Asp Leu Glu Arg Thr Lys Ile Lys Met Gln Lys Gln  
 115 120 125

20 Met Asn Leu Arg Ile Glu Cys Phe Gln Ala Lys Ala Asn Glu Val Arg  
 130 135 140

25 Gly His Leu Glu Gln Leu Asp Ala Asp Glu Thr Gln  
 145 150 155

<210> 77  
 <211> 942  
 <212> DNA  
 <213> Ictalurus punctatus

30

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <223> GenBank accession number CK419466.1

35

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (832)..(834)  
 <223> n is a, c, g, or t

<400> 77  
 ccacgcgtcc ggaacttctg aactaattag cgcctttttt gtgctttttt caaaaacatg 60  
 40 gagcttatga acgaagattt aaaaatgtac ttttacgaga acagattagc ttcttattca 120  
 gggtggccgt ttgatgagga ctgctgcctgc acgtcggata atatggcca agctggtttc 180  
 atccacaaac cactgaaaa cagtccggat gtggcccagt gcttcttctg ctttaaagag 240  
 45 ctggagggtt gggagcctga ggatgatcct ctcaaggaac acaagtctca ctctccaact 300  
 tgcaatttca ttctgctgaa aaagccagtg gaggagctca cagtggagga gattctgaag 360  
 ctgcagaaag agaggcaaaa gttccacatt aaaatggcct gcagacaagt aattgagaag 420  
 tttgaggaag cagcaaatc gagaagaggt gacattatca aactagccat ggaaggctga 480

50

atggagattt ctgtcttttc ctcctatgat tgctcttttg ttatcgggtca tggacatggt 540  
 cccaagctgc actaccatgc ttgtgtttac taaaaaaga atttattaag agattgacat 600  
 tattcttcac aacctcttta atggagtttt atatcaactc cccatgatta cagaggtgga 660  
 5 ttcatacagc ctggctaagt tccttctctg tattcatgat gttgcatgta taaaacagct 720  
 agatactgta attggaactg aacagtcctt taagtttaag tttttgtcca tgttttccta 780  
 gtctgtaatg acatgaaagc tattatgact tggcatatcc tccttattta tnnnatatat 840  
 10 tattattata attattatnt taatttttat tttttttttt ttttacaag tgtcttcaaa 900  
 agttcacatt gtctatagag cactcagaca tttgacaatt tt 942

15 <210> 78  
 <211> 142  
 <212> PRT  
 <213> Danio rerio

20 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <223> GenBank accession number NP\_919378.1  
 <400> 78

Met Asp Leu Ala Ser Asp Asp Gln Thr Lys Met Tyr Phe Tyr Glu Asn  
 1 5 10 15

25 Arg Leu Gln Thr Phe Val Gly Trp Pro Phe Glu Glu Gly Cys Val Cys  
 20 25 30

Thr Pro Glu Asn Met Ala Lys Ala Gly Phe Ile His Thr Pro Ser Glu  
 35 40 45

30 Asn Ser Pro Asp Ile Ala Gln Cys Phe Phe Cys Leu Lys Glu Leu Glu  
 50 55 60

35 Gly Trp Glu Pro Glu Asp Asp Pro Glu Lys Glu His Lys Ala His Ser  
 65 70 75 80

Pro Ser Cys Asp Phe Ile Leu Leu Lys Lys Thr Val Asp Ser Leu Thr  
 85 90 95

40 Val Glu Glu Phe Leu Lys Leu Gln Lys Glu Arg Gln Lys Phe Ile Ile  
 100 105 110

Lys Lys Ser Cys Gly His Ala Ile Asp Lys Phe Glu Asp Ala Val Lys  
 115 120 125

45 Leu Lys Arg Asn Gln Ile Ile Gln Thr Ala Met Gly Glu Glu  
 130 135 140

50 <210> 79  
 <211> 128

<212> PRT  
<213> Danio rerio

<220>  
<221> misc\_feature  
<223> GenBank accession number NP\_660196.1

<400> 79

Met Tyr Ser Tyr Glu Lys Arg Leu Gln Thr Phe Ser Glu Trp Pro Phe  
1 5 10 15

Arg Glu Asp Cys Gln Cys Thr Pro Glu Leu Met Ala Lys Ala Gly Phe  
20 25 30

Val His Cys Pro Ser Glu Asn Glu Pro Asp Val Ala Cys Cys Phe Tyr  
35 40 45

Cys Leu Arg Glu Leu Glu Gly Trp Glu Pro Asp Asp Asn Pro Trp Ser  
50 55 60

Glu His Ala Lys Arg Ser Pro Asn Cys Ala Phe Leu His Met Ser Lys  
65 70 75 80

Thr Phe Asp Glu Leu Thr Ala Ile Glu Tyr Phe His Leu Glu Gln Glu  
85 90 95

Arg Leu Arg Ile Tyr Ile Lys Lys Met Gly His Arg Lys Ile Ala Tyr  
100 105 110

Phe Arg Asp Glu Val Glu Ala Thr Ser Lys Asn Leu Arg Ala Leu Ile  
115 120 125

<210> 80  
<211> 110  
<212> PRT  
<213> Tetraodon nigroviridis

<220>  
<221> misc\_feature  
<223> GenBank accession number CAG04432.1

<400> 80

Met Asn Pro Tyr Asn Asp Gln His Leu Lys Met Tyr Phe Tyr Glu Asn  
1 5 10 15

Arg Leu Lys Thr Phe Glu Gly Trp Pro Phe Glu Glu Asp Cys Leu Cys  
20 25 30

Thr Pro Glu Asn Met Ala Lys Ala Gly Phe Val His Thr Pro Ser Glu  
35 40 45

Asn Ser Pro Asp Thr Ala Met Cys Phe Phe Cys Leu Lys Glu Leu Glu  
50 55 60

Gly Trp Glu Pro Asp Asp Glu Pro Lys Lys Glu His Lys Ser His Ser  
65 70 75 80

5

Pro Ser Cys His Phe Ile Ala Leu Lys Lys Lys Val Glu Glu Leu Ser  
85 90 95

Val Glu Glu Phe Val Lys Leu Gln Met Glu Arg Gln Lys Phe  
100 105 110

10

<210> 81  
<211> 116  
<212> PRT  
<213> Tetraodon nigroviridis

15

<220>  
<221> misc\_feature  
<223> GenBank accession number CAG07433.1

<400> 81

20

Met Ala Ser Ile Asp Val Leu Lys Glu Arg Phe Ser Ser Tyr Asp Arg  
1 5 10 15

Met Tyr Arg Gln Glu Leu Arg Glu Arg Thr Phe Val Asp Trp Pro Phe  
20 25 30

25

Arg Glu Asp Cys Asn Cys Thr Pro Glu Lys Met Ala Lys Ala Gly Phe  
35 40 45

Val His Cys Pro Ser Glu Asn Glu Pro Asp Val Ala Cys Cys Phe Phe  
50 55 60

30

Cys Leu Ile Glu Leu Glu Gly Trp Glu Pro Asp Asp Asp Pro Trp Ser  
65 70 75 80

Glu His Val Lys Arg Tyr Pro Asn Cys Gly Phe Leu Thr Met Lys Lys  
85 90 95

35

Asp Phe Thr Glu Leu Thr Val Gly Glu Tyr Phe Leu Met Glu Gln Glu  
100 105 110

40

Arg Leu Lys Val  
115

<210> 82  
<211> 153  
<212> PRT  
<213> Drosophila melanogaster

45

<220>  
<221> misc\_feature  
<223> GenBank accession number AAF55399.1

50

<400> 82

Met Glu Ser Pro Val Val Asn Glu Val Ala Ala Ser Leu Gly Gly Glu  
1 5 10

5

Lys Leu Glu Val Phe Arg Lys Leu Asn Leu Leu Glu Gln His Arg Val  
20 25 30

Glu Ser Tyr Lys Ser Trp Pro Phe Pro Glu Thr Ala Ser Cys Ser Ile  
35 40 45

10

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

15

Asn Asp Thr Ala Thr Cys Phe Val Cys Gly Lys Thr Leu Asp Gly Trp  
65 70 75 80

Glu Pro Glu Asp Asp Pro Trp Lys Glu His Val Lys His Ala Pro Gln  
85 90 95

20

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

Gln Phe Leu Glu Ile Leu Gly Thr Val Val Lys Gly Ser Ile Glu Lys  
115 120 125

25

Thr Cys Lys Ala Phe Lys Ser Ser Phe Val Arg Glu Asn Glu Lys Arg  
130 135 140

Leu Asp Glu Phe Thr Arg Asn Gln Lys  
145 150

30

<210> 83  
<211> 155  
<212> PRT  
<213> Caenorhabditis elegans

35

<220>  
<221> misc\_feature  
<223> GenBank accession number NP\_505949.1

<400> 83

40

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

Tyr Lys Asp Arg Leu Met Thr Phe Lys Asn Phe Glu Tyr Asp Arg Asp  
20 25 30

45

Pro Asp Ala Lys Cys Thr Ser Gln Ala Val Ala Gln Ala Gly Phe Tyr  
35 40 45

Cys Thr Gly Pro Gln Ser Gly Lys Cys Ala Phe Cys Asn Lys Glu Leu  
50 55 60

50

Asp Phe Asp Pro Glu Asp Asp Pro Trp Tyr Glu His Thr Lys Arg Asp  
 65 70 75 80  
 Glu Pro Cys Glu Phe Val Arg Ile Gly Lys Leu Asp Asp Ser Glu Leu  
 5 85 90 95  
 Thr Ile Asn Asp Thr Val Arg Leu Ser Gln Thr Ala Met Ile Met Thr  
 100 105 110  
 Lys Leu Phe Glu His Glu Met Met Ile Asn Asn Leu Ser Asn His Ser  
 115 120 125  
 Ser Ser Asp Ala Leu Phe Asp Gln Leu Lys Lys Val Pro Asn Thr Ala  
 130 135 140  
 Ser Thr Thr Lys Ser Asn Ser Arg Arg Gly Lys  
 145 150 155  
 <210> 84  
 <211> 142  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> HumanSurvivin(R18E, H77A, C84A, A128P)  
 <400> 84  
 Met Gly Ala Pro Thr Leu Pro Pro Ala Trp Gln Pro Phe Leu Lys Asp  
 1 5 10 15  
 His Glu Ile Ser Thr Phe Lys Asn Trp Pro Phe Leu Glu Gly Cys Ala  
 20 25 30  
 Cys Thr Pro Glu Arg Met Ala Glu Ala Gly Phe Ile His Cys Pro Thr  
 35 40 45  
 Glu Asn Glu Pro Asp Leu Ala Gln Cys Phe Phe Cys Phe Lys Glu Leu  
 50 55 60  
 Glu Gly Trp Glu Pro Asp Asp Asp Pro Ile Glu Glu Ala Lys Lys His  
 65 70 75 80  
 Ser Ser Gly Ala Ala Phe Leu Ser Val Lys Lys Gln Phe Glu Glu Leu  
 85 90 95  
 Thr Leu Gly Glu Phe Leu Lys Leu Asp Arg Glu Arg Ala Lys Asn Lys  
 100 105 110  
 Ile Ala Lys Glu Thr Asn Asn Lys Lys Lys Glu Phe Glu Glu Thr Pro  
 115 120 125  
 Lys Lys Val Arg Arg Ala Ile Glu Gln Leu Ala Ala Met Asp  
 130 135 140

Формула изобретения

1. Вакцина, вызывающая у человека иммунный ответ на сурвивин человека,

содержащая:

(а) пептид или нуклеиновую кислоту, кодирующую пептид, происходящий от мутированного сурвивина курицы, который (i) имеет последовательность SEQ ID NO: 12, (ii) содержит VIR-домен, имеющий 50-90% аминокислотную идентичность VIR-домену, располагающемуся от Asp 16 до Leu87 в сурвивине человека, и (iii) содержит мутации N97E, T99M, V100L и Q101G, которые способствуют презентации антигена Т-клеткам путем связывания с молекулами МНС, причем указанный пептид возможно слит с Fc-группировкой, и

(б) возможно адъювант.

2. Вакцина по п.1, где сурвивин курицы содержит мутацию внутри VIR-домена, которая, по существу, уничтожает биологическую активность, приписываемую VIR-домену.

3. Вакцина по п.2, где указанная мутация уничтожает антиапоптотическую активность VIR-домена.

4. Вакцина по п.2, где указанный пептид, происходящий от указанного сурвивина курицы, содержит аминокислотную замену в одной или более чем одной из позиций, соответствующих Arg18, Pro47, Cys57, Cys60, His77 и Cys84 сурвивина человека.

5. Вакцина по п.1, где вакцина способна активировать Т-клетки, распознающие последовательность пептида сурвивина человека в комплексе с молекулой МНС.

6. Вакцина по п.1, включающая цитокин, выбранный из группы, состоящей из IL-2, IL-7, IL-12, IL-18, IL-21, IL-23 и GM-CSF.

7. Вакцина по п.1, где нуклеиновая кислота, кодирующая указанный пептид, содержит промотор млекопитающих.

8. Вакцина по п.7, где нуклеиновая кислота представляет собой голую ДНК (naked DNA).

9. Вакцина по п.1, где нуклеиновая кислота приготовлена в виде препарата с реагентом, который повышает трансфекцию клеток млекопитающих.

10. Вакцина по п.1, где нуклеиновая кислота представляет собой часть вирусной частицы.

11. Вакцина по п.10, где вирусная частица представляет собой аденовирусную частицу.

12. Вакцина по п.1, где вакцина содержит бактерию, содержащую указанную нуклеиновую кислоту.

13. Вакцина по п.12, где бактерия представляет собой Salmonella.

14. Вакцина по п.1 для применения в способе иммунизации человека против опухолевых клеток, сверхэкспрессирующих сурвивин человека.

15. Вакцина по п.1 для применения в лечении опухолей, сверхэкспрессирующих сурвивин человека.

16. Вакцина, вызывающая у человека иммунный ответ на сурвивин человека, содержащая:

(а) мутированный сурвивин курицы, содержащий мутации N97E, T99M, V100L и Q101G и имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:12, где указанные мутации способствуют презентации антигена Т-клеткам путем связывания с молекулами МНС, и сурвивин курицы содержит VIR-домен, имеющий 50-90% аминокислотную идентичность VIR-домену, располагающемуся от Asp 16 до Leu87 в сурвивине человека, и

(б) возможно адъювант

для применения в лечении рака легких.

17. Фармацевтическая композиция, вызывающая иммунный ответ на сурвивин человека, содержащая вакцину по любому из пп.1-13, возможно вместе с приемлемым носителем, разбавителем или эксципиентом.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

	10	20	30	40	
	-----+-----*-----+-----+-----+-----				
1	M-----GA--PTLPPAWQPFLK	DHRISTFKNWPFL	EGCACTPERMAEAG		человек
1	.....D.....				собака
1	-----S--S.....LY.....A..				свинья
1	-----S--S.....LY.....				корова
1	-----SS.....LY.....				кошка
1	-----A..QI..LY..NY..A.....D.....				мышь
1	-----TA...I..MY.....Y.....D.S.....				крыса
1	-----				орангутанг
1	-----A.YAEM..KE.LVY.VST.AA..R...T.....A..				курица
1	.LSISPIVSLRRCNE.SM.DE.RLYNLAT.LR..S...T.D.....				лягушка (Six)
1	.-SSCSIVSLLP.DKE.SM.DE.RLYKLAT.LR..S...T.D.....				лягушка 2
1	.YSAKN--RFVQAV-QR-.QDFKNMYDY.A.LA..AD...T.N.K...S..K..				лягушка
1	-----ELMNED-LKMYFYEN.LASYSG...D.D...SDN..K..				сом
1	-----DLASDDQTKMYFYEN.LQ..VG...E...V...N..K..				полосатый данио
1	-----YSYEK.LQ..SE...R.D.Q...L..K..				полосатый данио 2
1	-----N.YNDQHLKMYFYEN.LK..EG...E.D.L...N..K..				рыба-собака
1	.AS-----IDVLKER-FSSYDRMYRQEL.ER..VD...R.D.N...K..K..				рыба-собака 2
	50	60	70	80	90
	-----+-----*-----+-----+-----+-----				
43	FIHCPTENEPDLAQCFFCFKELEGWEP	DDDDPIE	EHKKHSSGCAFLSVK	KQFEELT	человек
43	.....				собака
43	.....				свинья
43	.....L.....				корова
43	.....				кошка
43	.....N...R...P...T...M...				мышь
43	.....N...R...P...T...V...				крыса
43	.....				орангутанг
45	.V...S...S..VV...L.....L.....A...AALQ.DPSN..				курица
56	.V...D.S..VVK...L.....Q.E...MD...PS.L.IAL..KA...				лягушка (Six)
55	.V...SD.S..VVK...L.....Q.E...MD...PS.L.IAL..KA...				лягушка 2
52	.V...V...V.C...L.....WT..S.R.AN.G...LT.CVND..				лягушка.
41	...K...S..V.....E...LK...S..PT.N.ILL..PV...				сом
42	...T.S...S..I.....L.....E...EK...A..PS.D.ILL..TVDS..				полосатый данио
32	.V...S...V.C..Y.LR.....N.WS..A.R.PN...HMS.T.D...				полосатый данио2
42	.V.T.S...S..T.M...L.....E.KK...S..PS.H.IAL..KV...S				рыба-собака
48	.V...S...V.C...LI.....WS..V.RYPN.G..TM..D.T...				рыба-собака 2
	100	110	120	130	140
	-----+-----+-----+-----+-----				
98	LGEFLKLDREKAKNKIAKETN	NKKKEFEETAKK	VRRRAIEQLAAMD		человек (SEQ ID NO: 8)
98	.....				собака (SEQ ID NO: 9)
98	.S.....K.....Q.....C.....SE				свинья (SEQ ID NO: 39)
98	.S.....K.....Q.....C.....V...				корова (SEQ ID NO: 40)
98	.S.....K.....H.Q.....R..C.....LE				кошка (SEQ ID NO: 41)
98	VS.....Q.....Q.....TT.QS.....				мышь (SEQ ID NO: 10)
98	VS.....KQ.....Q.....RRT..QS.....LR				крыса (SEQ ID NO: 42)
98	.....				орангутанг (SEQ ID NO: 43)
100	VQ.....KK.T..V.K.AISQ.ETDI.DV..G..H...NMGP				курица (SEQ ID NO: 11)
111	.S.....L.HT.I.MQ.QM.LHIER.QAK.NE..GHL.K.D.DETQ				лягушка (Six) (SEQ ID NO: 13)
110	.S.....L..T.I.MQ.QM.LRIEC.QAK.NE..GHL...D.DETQ				лягушка 2 (SEQ ID NO:47)
107	MEG..R.EGD.I.SFYR.FSTVVLYQV..EMTAATKRLLEYFSNQHQCSIDLHDH				лягушка (SEQ ID NO: 46)
97	VE..I...QK..Q.FH.KMACRQVIEK...A..SR.GD.IK..MEG				сом (SEQ ID NO:52)
96	VE.....QK..Q.FI.K.SCGHAIDK..DAV.LK.NQ.I.-T..GEE				полосатый данио (SEQ ID NO:48)
87	AI.YFH.EQ..LRIY.K.MGHR.IAY.RDEVEATSKNLRA.I				полосатый данио 2 (SEQ ID NO:49)
97	VE..V..QM..Q.F				рыба-собака (SEQ ID NO:50)
103	V..YFLMEQ..L.V				рыба-собака 2 (SEQ ID NO:51)

Фиг.1

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	
	98,6	98,6	98,6	100	90,3	91,7	100	77,8	69,4	68,1	70,8	65,3	68,1	65,3	63,9	65,3	1
		97,2	97,2	98,6	88,9	90,3	98,6	76,4	68,1	66,7	69,4	66,7	66,7	63,9	62,5	63,9	2
			97,2	98,6	88,9	90,3	98,6	76,4	68,1	66,7	70,8	65,3	68,1	65,3	63,9	65,3	3
				98,6	88,9	90,3	98,6	76,4	68,1	66,7	69,4	63,9	66,7	65,3	62,5	63,9	4
					90,3	91,7	100	77,8	69,4	68,1	70,8	65,3	68,1	65,3	63,9	65,3	5
						94,4	90,3	75,0	69,4	68,1	69,4	66,7	65,4	69,4	65,3	66,7	6
							91,7	72,2	68,1	66,7	69,4	63,9	65,3	69,4	65,3	66,7	7
								77,8	69,4	68,1	70,8	65,3	68,1	65,3	63,9	65,3	8
									76,4	77,8	72,2	65,3	69,4	66,7	68,1	66,7	9
										98,6	68,1	68,1	69,4	65,3	69,4	65,3	10
											66,7	66,7	70,8	66,7	70,8	66,7	11
												62,5	65,3	76,4	66,7	79,2	12
													76,4	61,1	73,6	59,7	13
														66,7	83,3	66,7	14
															69,4	81,9	15
																68,1	16
																	17

Фиг.2

20 30 40 50 60

---\*+-----+-----\*+-----\*

16 DHRISTFKNWPFLG--CACTPERMAEAGFIHCPTENEPDLAQCFKKELEGWE человек  
 29 Q..VESY.S...P.T--AS.SISK.....YWTG.KR.N.T.T..V.G.T.D... BIR муха  
 19 -D.LM....FEYDRDPDAK..SQAV.Q...YCTGPQS----GK.A..N...D-FD BIR червь

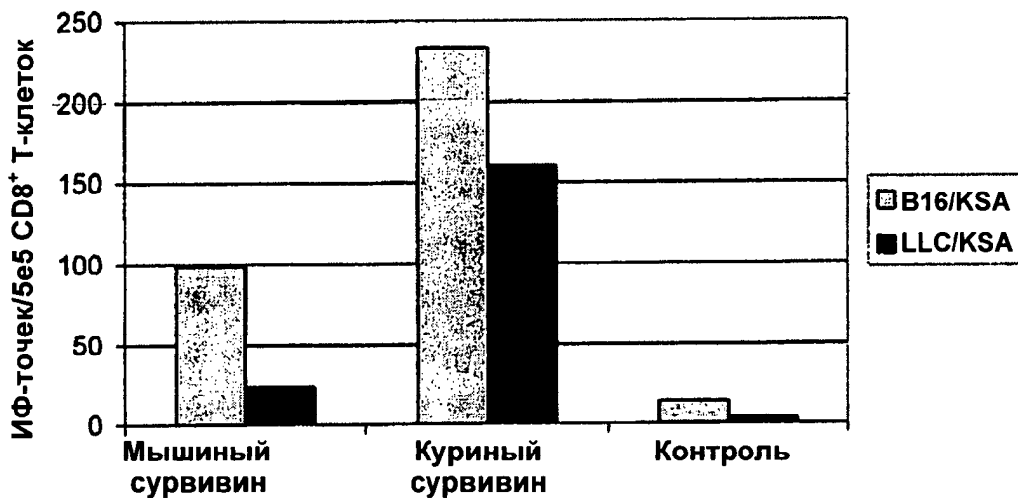
70 80

---+-----\*+-----\*

69 PDDDP1EEHKKHSSGCAFL человек SEQ ID NO: 63  
 82 .E...WK..V..APQ.E.A BIR муха SEQ ID NO: 53  
 68 .E...WY..T.RDEP.E.V BIR червь SEQ ID NO: 54

Фиг.3

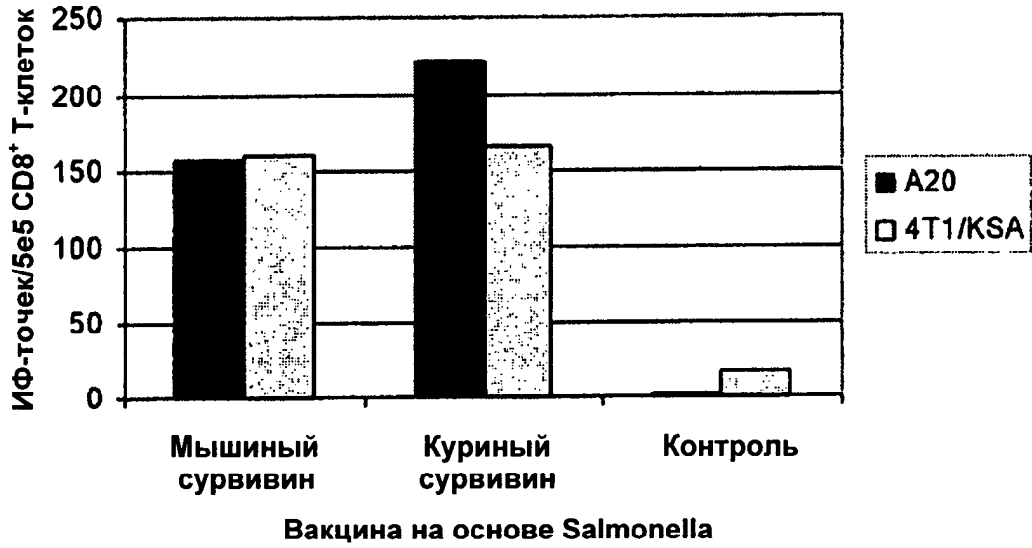
**Мыши C57BL/6**



Вакцина на основе Salmonella

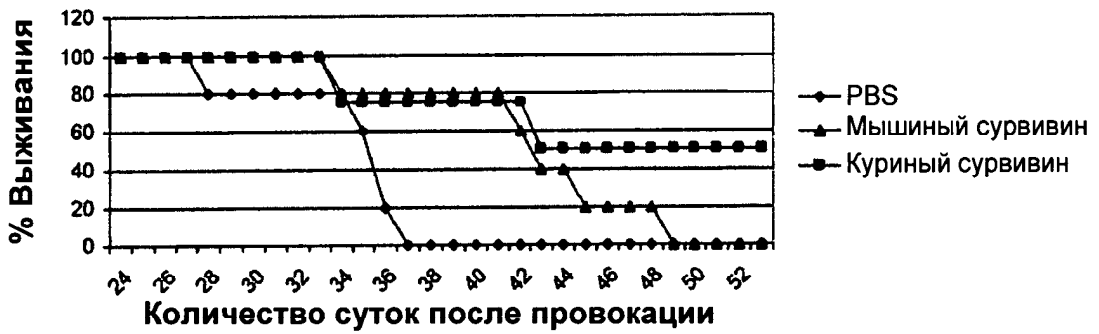
Фиг.5

### Мыши Balb/c



Фиг.6

### Провокация опухолевыми клетками СТ26/KSA

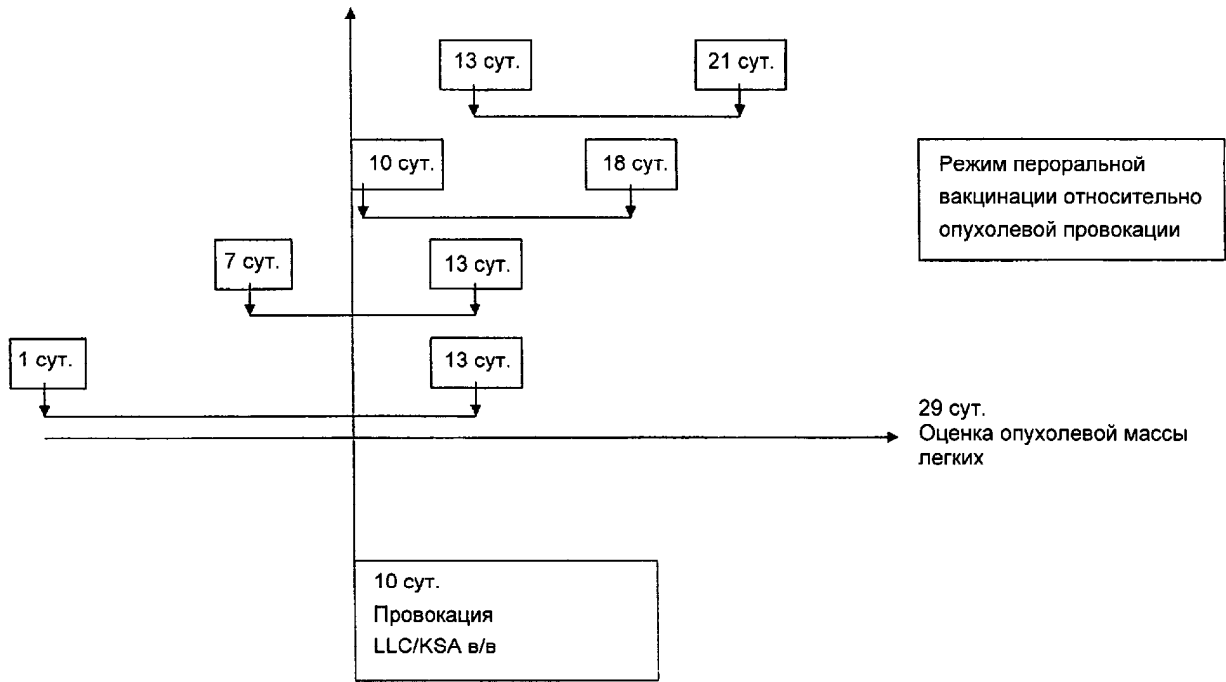


Фиг.7

### Провокация опухолевыми клетками LLC/KSA



Фиг.8



Фиг.9

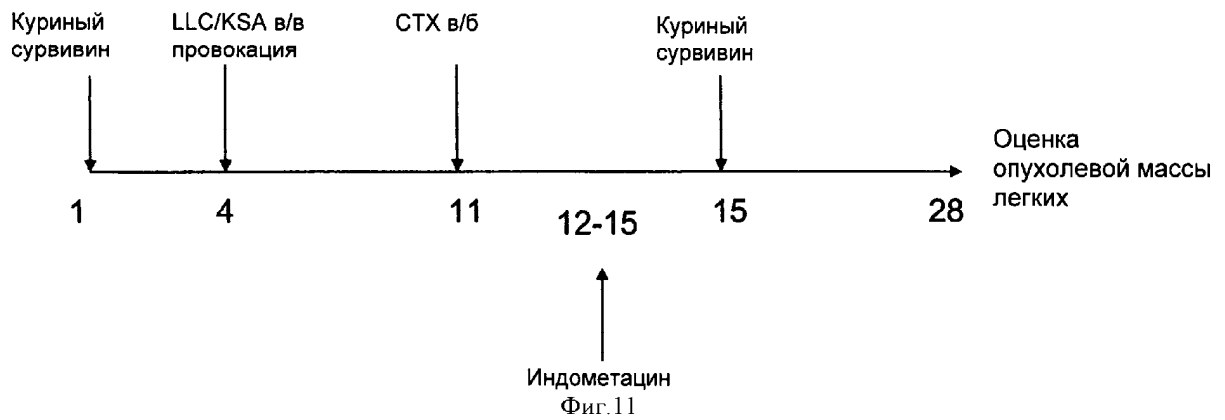
LLC/KSA в/в провокация на 10-е сутки

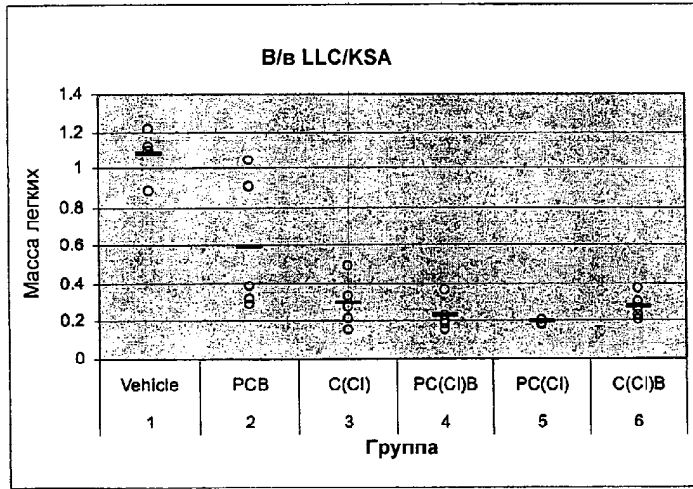


Принудительное кормление, сутки	Оценка метастазирования легких
1, 13	0, 0, 1, 1, 1
7, 13	1, 2, 2, 2, 3
10, 18	2, 2, 3, 3, 3
13, 21	3, 3, 3, 3, 3
PBS	2, 2, 3, 3, 3

Оценка	Описание
3	Более 50% легкого поражено опухолью
2	От 5 до 50% легкого поражено опухолью
1	Менее 5% поверхности поражено опухолью
0	Отсутствуют видимые колонии опухоли

Фиг.10

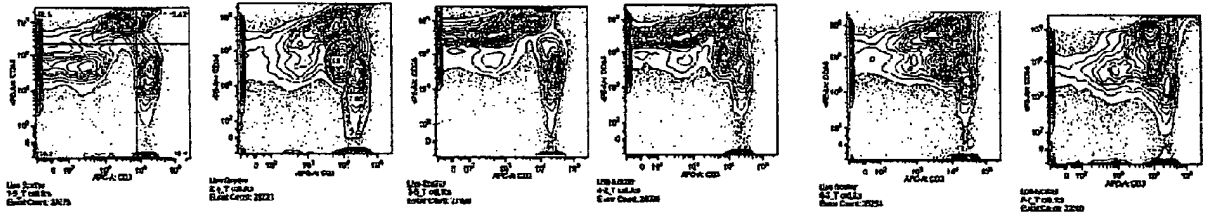




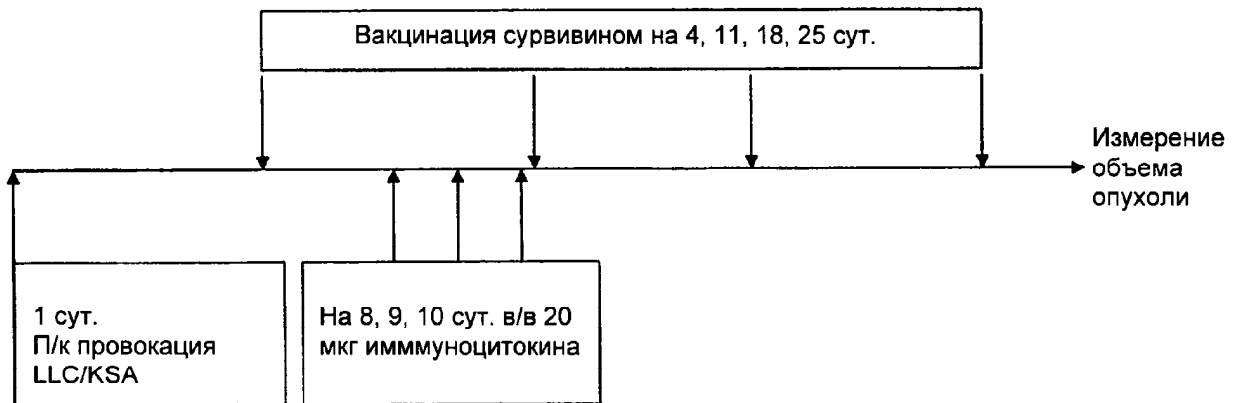
Протокол	Оценка метастазирования легких
Носитель-контроль	3, 3, 3, 3, 3
Первичная иммунизация- Провокация- Повторная иммунизация	1, 2, 2, 3, 3
СТХ + индометацин	1, 1, 2, 3, 3
Первичная иммунизация- Провокация- СТХ + индометацин- Повторная иммунизация	0, 1, 1, 1, 1
Первичная иммунизация- Провокация- СТХ + индометацин	1, 1, 1, 1, 1
Провокация- СТХ + индометацин- Повторная иммунизация	1, 1, 2, 2, 2

Фиг.12

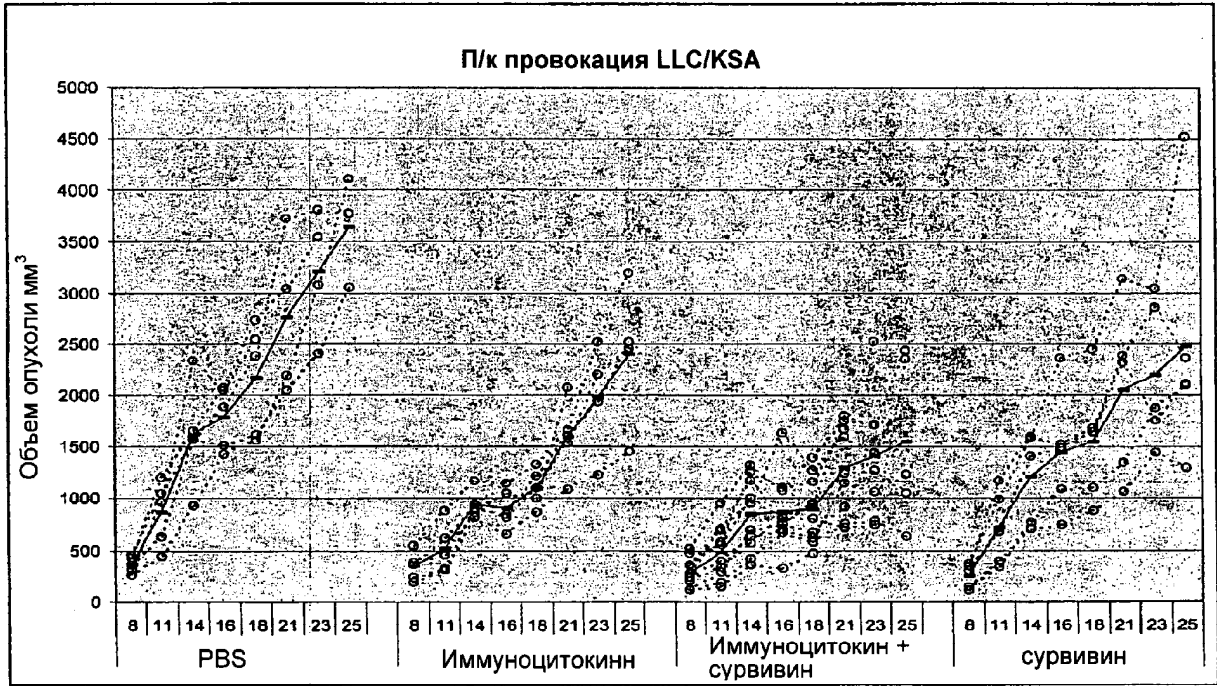
Носитель      PCB      CI      PC(CI)B      PC(CI)      C(CI)B



Фиг.13



Фиг.14



Фиг. 15