



(51) МПК

*C12N 1/21* (2006.01)*A61K 38/21* (2006.01)*C12N 15/22* (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,  
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: 2005114012/15, 07.10.2003

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
07.10.2003(30) Конвенционный приоритет:  
08.10.2002 US 60/417,124

(43) Дата публикации заявки: 20.01.2006

(45) Опубликовано: 10.10.2008 Бюл. № 28

(56) Список документов, цитированных в отчете о  
поиске: US 6121247 A, 19.09.2000. US 4695455  
A, 22.09.1987.(85) Дата перевода заявки РСТ на национальную фазу:  
11.05.2005(86) Заявка РСТ:  
US 03/31815 (07.10.2003)(87) Публикация РСТ:  
WO 2004/087864 (14.10.2004)

Адрес для переписки:  
129010, Москва, ул. Б.Спасская, 25, стр.3,  
ООО "Юридическая фирма Городисский и  
Партнеры", пат.пов. Е.Е.Назиной, рег. № 517

(72) Автор(ы):

ГАЕРТНЕР Фрэнк Х. (US),  
ЛИ Стейси Линн (US),  
ШАТТЕР Роберт В. (US)

(73) Патентообладатель(и):

ДАУ АГРОСАЙЕНСИЗ ЛЛС (US)

RU 2 3 3 5 5 3 5 C 2

RU 2 3 3 5 5 3 5 C 2

## (54) ИЗМЕНЕННЫЕ РЕКОМБИНАНТНЫЕ КЛЕТКИ (ARC), ПРЕДНАЗНАЧЕННЫЕ ДЛЯ ПРОДУЦИРОВАНИЯ И ДОСТАВКИ АНТИВИРУСНЫХ АГЕНТОВ, АДЬЮВАНТОВ И АКСЕЛЕРАТОРОВ ВАКЦИН

(57) Реферат:

Настоящее изобретение относится к композициям активного цитокина-интерферона-гамма, а также к недорогим способам получения указанных композиций и к способам лечения и ускорения иммунной реакции, которые включают

введение измененной рекомбинантной клетки (ARC) представляющей собой P. Fluorescens, содержащей гетерологичный ген интерферона-гамма. Преимущество изобретения заключается в повышении удельной активности интерферона. 5 н. и 17 з.п. ф-лы, 13 табл., 13 ил.



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,  
PATENTS AND TRADEMARKS

(51) Int. Cl.  
**C12N 1/21** (2006.01)  
**A61K 38/21** (2006.01)  
**C12N 15/22** (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: **2005114012/15, 07.10.2003**  
(24) Effective date for property rights: **07.10.2003**  
(30) Priority:  
**08.10.2002 US 60/417,124**  
(43) Application published: **20.01.2006**  
(45) Date of publication: **10.10.2008 Bull. 28**  
(85) Commencement of national phase: **11.05.2005**  
(86) PCT application:  
**US 03/31815 (07.10.2003)**  
(87) PCT publication:  
**WO 2004/087864 (14.10.2004)**

Mail address:  
**129010, Moskva, ul. B.Spaskaja, 25, str.3,  
OOO "Juridicheskaja firma Gorodisskij i  
Partnery", pat.pov. E.E.Nazinoj, reg. № 517**

(72) Inventor(s):  
**GAERTNER Frehnik Kh. (US),  
LI Stejsi Linn (US),  
ShATTER Robert V. (US)**  
(73) Proprietor(s):  
**DAU AGROSAJENSIZ LLS (US)**

(54) **ALTERNATED RECOMBINANT CELLS (ARC) INTENDED FOR PRODUCTION AND TRANSPORT OF ANTIVIRAL AGENTS, ADJUVANTS AND VACCINE ACCELERATORS**

(57) Abstract:  
FIELD: chemistry.  
SUBSTANCE: invention relates to compositions of active cytokine - interferone-gamma, and to cost-effective methods of obtaining the claimed compositions and of treatment and immune reaction

acceleration. The methods involve introduction of alternated recombinant cell (ARC) represented by P. Fluorescens and including heterologic gene of interferone-gamma.

EFFECT: increased specific activity of interferone.  
22 cl, 10 ex, 13 tbl, 13 dwg

RU 2 335 535 C 2

RU 2 335 535 C 2

Перекрестная ссылка на родственную заявку

Данная заявка притязает на приоритет предварительной заявки на патент США № 60/417124, поданной 8 октября 2002 г., которая полностью включена в данную заявку в качестве ссылки, в том числе все фигуры, таблицы, последовательности и формулы.

5 Уровень техники

Цитокины и хемокины являются важными элементами функциональных иммунных систем. Например, интерферон является одним из первых рекомбинантных лекарственных средств, полученных с помощью биотехнологии, который применяется в качестве

10 Гамма-интерферон (IFN- $\gamma$ ) является цитокином, который вызывает сильную противовирусную и иммунную реакции у животных [1-3; 6; 8; 13; 17; 18; 20; 22; 23; 25]. Вакцины, усиленные IFN- $\gamma$  [13;18], применимы для лечения таких болезней как, например, транспортная лихорадка и мастит у крупного рогатого скота. Однако при современной технологии

15 получения IFN- $\gamma$  является неустойчивым и чрезвычайно дорогостоящим препаратом. При стоимости в несколько сот долларов за миллиграмм и требуемой для лечения дозировке в несколько миллиграммов на одну дозу применение IFN- $\gamma$  в качестве противовирусного агента или вакцинного адъюванта для животных является практически невозможным. Поэтому

20 возможности интерферонов и других цитокинов (см. таблицу I) в качестве волшебного средства для лечения болезней до сих пор не реализованы в полной мере [1].

IFN- $\gamma$  оказывает прямое или косвенное воздействие почти на все элементы систем врожденного и приобретенного иммунитета [1] у крупного рогатого скота и других животных, таких как млекопитающие, птицы, рыба и рептилии. Кроме того, IFN- $\gamma$  является

25 одним из самым сильных, может быть, самым сильным плейотропом цитокинов, оказывающим глубокое влияние на процессинг и презентацию антигенов, ингибирование миграции лимфоцитов, активацию макрофагов, продуцирование антител против В-лимфоцитов [21], активность естественных клеток-киллеров (NK) и увеличение молекул на поверхности лейкоцитов для направленной миграции и иммунного распознавания. Сильные рецепторы для IFN- $\gamma$  расположены на Т- и В-лимфоцитах, NK-клетках, моноцитах,

30 макрофагах, фибробластах, нейтрофилах, эндотелиальных клетках и клетках гладких мышц. Кроме того, благодаря противовирусному действию IFN- $\gamma$  является главной мишенью для губительного воздействия вирусов. Например, вирусы кодируют белки, которые могут инактивировать IFN- $\gamma$ , блокировать IFN-индуцируемые пути активации противовирусных антител и прерывать межклеточную передачу сигналов IFN- $\gamma$ .

35 Биологически активный бычий IFN- $\gamma$  был впервые клонирован и синтезирован в *Escherichia coli* в 1986 г. [5]. Нуклеотидная последовательность конского IFN- $\gamma$ , описанная в 1994 г., была на 67% идентична человеческому IFN- $\gamma$  и на 78% идентична бычьему IFN- $\gamma$ . Структура рекомбинантного куриного IFN- $\gamma$  была описана в 1999 г., при этом активная усеченная форма (усеченная в положении остатка lys 133) была экспрессирована

40 в *E. coli*. Установлено, что данная трехмерная структура подобна бычьему и человеческому IFN- $\gamma$  несмотря на то, что общая идентичность аминокислот составляет только 32% [14].

Сущность изобретения

Настоящее изобретение относится к композициям активного цитокина и/или хемокина, а

45 также к недорогим способам получения указанных композиций, упаковке композиций активного цитокина и/или хемокина в измененные клетки, к процессингу и доставке композиций активного цитокина и/или хемокина. Данное изобретение относится также к способам лечения и способам ускорения иммунной реакции, которые предусматривают введение активного гамма-интерферона и других композиций цитокина и/или хемокина

50 животным или человеку.

В соответствии с одним аспектом данного изобретения IFN- $\gamma$  и другие цитокины могут быть экспрессированы в целом ряде бактериальных клеток, включая бактерии *Pseudomonas fluorescens*, при помощи методов рекомбинантных ДНК, хорошо известных в

данной области. В результате соответствующей реконструкции гена цитокина и введения его в плазмидный вектор хозяина точно между сильным регулируемым промотором и терминаторами транскрипции/трансляции можно экспрессировать IFN- $\gamma$  в определенном чужеродном хозяине. Пригодность любого такого хозяина можно легко проверить  
 5 обычными методами, известными специалисту в данной области, без излишнего экспериментирования. После экспрессии IFN- $\gamma$  или других цитокинов в трансформированных бактериальных клетках на высоком уровне указанные клетки можно изменить соответствующими агентами, включая тепловые и химические агенты, которые убивают (стерилизуют) клетки, стабилизируют экспрессированный активный цитокин и  
 10 модифицируют оболочку клетки для оптимального высвобождения упакованного в клетку цитокина. Например, используемый в данной заявке способ стерилизации/изменения клеток *Pseudomonas fluorescens*, экспрессирующих IFN- $\gamma$ , представляет собой модификацию процесса, ранее применявшегося для продуцирования коммерческого биопестицида MVP [4; 9; 19]. В соответствии с указанным способом клетки *P.*  
 15 *fluorescens* обрабатывают йодом, таким как люголь, при pH около 4,3. Йод при указанном показателе pH полностью стерилизует культуру *in situ*, изменяет оболочку клетки, придавая ей физическую долговечность, и делает оболочку бактериальной клетки подверженной протеолитическому распаду [9]. Кроме того, указанный способ устраняет флокуляцию клеток и, по-видимому, уменьшает эндотоксические свойства оболочки клетки  
 20 *Pseudomonas*.

IFN- $\gamma$ -содержащие измененные рекомбинантные клетки (IFN- $\gamma$ /ARC) можно доставлять пероральным, назальным, глазным или парентеральным способом при помощи инъекций. Такие методы вакцинации IFN- $\gamma$ /ARC можно использовать для лечения человека и  
 25 животных, например, крупного рогатого скота; клетки ARC, содержащие бычий IFN- $\gamma$ , можно использовать в качестве профилактического средства для предотвращения транспортной лихорадки или для защиты новорожденных телят от вирусных болезней и/или бактериального гастроэнтерита. Кроме того, указанным способом можно лечить человека и животных, отличных от крупного рогатого скота, таких как лошади, свиньи,  
 30 куры и комнатные животные. Данный способ применим также для ослабления вызываемых стрессом заболеваний у животных и человека, а также для усиления иммунной реакции при использовании вышеуказанной композиции в качестве адъюванта и акселератора, для вакцинации человека путем введения IFN- $\gamma$ -содержащих клеток ARC в количествах, достаточных для достижения требуемого биологического действия.

#### 35 Краткое описание чертежей

На фиг.1 показана плазмидная карта pMYC1803.

На фиг.2 показана кодирующая последовательность, комплементарная последовательность и аминокислотная последовательность для синтетического бычьего гамма-интерферона без сигнального пептида.

40 На фиг.3 показана фотография результатов анализа методом SDS-PAGE, на которой изображены главные полосы бычьего  $\alpha$ - и  $\gamma$ -интерферона длиной соответственно около 18 и 17 кДа. Образцы культуры разводили в отношении 1:5 до погружения в гель. В каждую лунку добавляли 10 мкл.

На фиг.4 показана фотография результатов эксперимента методом электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (SDS-PAGE) с  
 45 использованием разрушенной при помощи французского пресса культуры *P. fluorescens*, содержащей BAI и BGI, на которой основная масса BAI изображена в виде осажденной фракции.

На фиг.5 в виде таблицы показаны результаты анализа устойчивости BGI/ARC.

50 На фиг.6А графически изображен белок MHC II, продуцированный клетками бычьей почки *in vitro* под действием гомогенного бычьего IFN- $\gamma$  (BGI), очищенного от рекомбинантной культуры *Escherichia coli*. На фиг.6В в виде графика сравнивается продуцирование белка MHC II клетками бычьей почки *in vitro* под действием 1)

нетрансформированных клеток MB324 *P. fluorescens* (ARC без вектора, без BGI); 2) трансформированных клеток MR1241 *P. fluorescens* (ARC с вектором, без BGI); 3) трансформированных клеток MR1605 *P. fluorescens* (BGI/ARC, ARC с вектором, с BGI); и 5) BGI, очищенного от рекомбинантных клеток *P. fluorescens*.

5 На фиг.7А показано воздействие рекомбинантного BGI (RecBoIFN $\gamma$ ), очищенного от *E. coli*, на продуцирование белка МНС II дендритными клетками. На фиг.7В сравнивается продуцирование МНС II дендритными клетками под действием 1) нетрансформированных контрольных клеток-хозяев *P. fluorescens* (MB324); 2) контрольных клеток ARC (MR1241), трансформированных только вектором рMYC1803; 3) клеток BGI/ARC (MR1605)  
10 (трансформированных геном BGI); и 4) BGI, очищенного от *P. fluorescens* (DOWIFN).

На фиг.8 показано влияние BGI/ARC на температуру тела экспериментальных телят.

На фиг.9 показано влияние BGI/ARC на массу тела экспериментальных телят.

На фиг.10 показано влияние BGI/ARC на клинические симптомы заболевания у крупного рогатого скота.

15 На фиг.11 показана активность иммуноадьюванта BGI/ARC и способность клеток BGI-ARC ускорять иммунную реакцию у телят на антиген (например, альбумин свиной сыворотки).

На фиг.12 показано воздействие BGI/ARC на пролиферацию лимфоцитов (при измерении методом введения  $^3\text{H}$  тимидина).

20 На фиг.13 показана активность птичьего IFN- $\gamma$ /ARC (CGI/ARC) на продуцирование оксида азота макрофагом цыплят.

#### Подробное описание изобретения

Настоящее изобретение относится к композициям активного цитокина и/или хемокина, экспрессированным в процессированных (измененных) бактериальных системах,  
25 именуемых в данном описании изобретения "измененные рекомбинантные клетки" или "ARC". ARC представляют собой рекомбинантные бактериальные клетки, содержащие экспрессированные гетерологичные белки, причем указанные клетки убивают специальными методами химической стерилизации, в результате применения которых  
30 изменяется оболочка бактериальных клеток. Вышеуказанный процесс изменяет свойства оболочки клетки бактерий одновременно в двух разных направлениях: А) происходит физическое упрочнение оболочки клетки, благодаря чему бактериальные клетки становятся более устойчивыми к разрушению под действием i) сдвигающего усилия; ii) ультразвуковых колебаний или iii) давления; и В) происходит денатурация белка в оболочке клетки, что делает клетки более подверженными разрушению в результате  
35 протеолитического гидролиза.

Разные варианты осуществления настоящего изобретения относятся к бактериальным клеткам ARC, трансформированным векторами, содержащими по крайней мере один гетерологичный ген, кодирующий IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9,  
40 IL-10, IL-11, IL-15, IL-16, IL-18, IL-23, IL-24, эритропоэтин, G-CSF, M-CSF, тромбоцитарный фактор роста (PDGF), MSF, лиганд FLT-3, EGF, фактор роста фибробластов (FGF, например, aFGF (FGF-1), bFGF (FGF-2), FGF-3, FGF-4, FGF-5, FGF-6 или FGF-7), инсулиноподобные факторы роста (например, IGF-1, IGF-2), эндотелиальный фактор роста сосудов (VEGF); интерфероны (например, IFN- $\gamma$ , IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ ); фактор ингибирования лейкоза (LIF); мерцательный нейротрофический фактор (CNTF); онкостатин  
45 М; фактор самоподдержания стволовых клеток (SCF); трансформирующие факторы роста (например, TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, TGF- $\beta$ 3) или хемокины (которые включают, не ограничиваясь ими, BCA-1/BLC-1, BRAK/Кес, CXCL16, CXCR3, ENA-78/LIX, зотаксин-1, зотаксин-2/MPIF-2, эксодус-2/SLC, фракталкин/нейротактин, GROальфа/MGSA, HCC-1, I-TAC, лимфотактин/ATAC/SCM, MCP-1/MCAF, MCP-3, MCP-4, MDC/STCP-1, ABCD-1,  
50 MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , MIP-2 $\alpha$ /GRO $\beta$ , MIP-3 $\alpha$ /эксодус/LARC, MIP-3 $\beta$ /эксодус-3/ELC, MIP-4/PARC/DC-CK1, PF-4, RANTES, SDF1 $\alpha$ , TARC или TECK) или цитокины и/или хемокины, приведенные в таблицах 1, 8 и 9. В предпочтительном варианте осуществления

изобретения клетки ARC содержат IFN- $\gamma$  (например, бычий, птичий (в частности, куриный), рыбий или человеческий IFN- $\gamma$ ). В другом предпочтительном варианте осуществления изобретения клетки ARC содержат IFN- $\gamma$  и IFN- $\alpha$  (например, бычий, птичий (в частности, куриный), рыбий или человеческий IFN- $\gamma$  и IFN- $\alpha$ ). В используемом здесь  
5 значении термин "ARC" означает измененные рекомбинантные клетки, содержащие один или несколько гетерологичных генов. Измененные рекомбинантные клетки, не содержащие гетерологичных генов интерферона или белка интерферона, определяются как "контрольные клетки ARC".

В некоторых вариантах осуществления изобретения бактериальные клетки  
10 коэкспрессируют один или несколько других гетерологичных генов, кодирующих антигены и/или антигенные белки. Неограничивающие примеры антигенов или антигенных белков включают, не ограничиваясь ими, аутоантигены, опухолевые антигены, тривакцины против кори, эпидемического паротита и краснухи (MMR), полиомиелитные вакцины,  
15 противостолбнячные вакцины, патогены, обычно присутствующие в окружающей среде (например, пищевые патогены, такие как виды *Klebsiella*, *Salmonella*, *Escherichia*, вирусы гепатита, вирусы гриппа и т.д.), и патогенные вещества, намеренно вводимые в среду, окружающую субъекта, такие как биотоксин (например, микотоксины, такие как трихотеценовый микотоксин (Т-2), стафилококковый энтеротоксин В, рицин или  
20 нейротоксин *Clostridium botulinum*, "вооруженные" бактериальные клетки (например, вирусы, содержащие ДНК- или РНК-вставки токсина, бактериальные или грибные клетки, трансформированные токсинами [например, микотоксины, такие как трихотеценовый микотоксин (Т-2), стафилококковый энтеротоксин В, рицин или нейротоксин *Clostridium botulinum*], вирусные патогены, грибные патогены, бактериальные патогены (например, вирус оспы, вирус сибирской язвы, вирус Эбола, *Yersinia pestis*), иммуномодуляторные  
25 белки, такие как суперантигены, сывороточные альбумины или белковые стабилизаторы. Разные варианты осуществления изобретения относятся к отдельным композициям ARC, экспрессирующим один гетерологичный ген (например, один цитокин, хемокин или белок). В некоторых вариантах осуществления изобретения коэкспрессированный белок или антиген, такой как сывороточный альбумин, кодирован ДНК, выделенной из организма  
30 животного требуемого вида. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления изобретения все белки, экспрессированные в бактериальной системе, находятся в одном векторе. Другие варианты осуществления изобретения относятся к трансформации бактериальных клеток несколькими векторами, кодирующими требуемые белки. В других вариантах осуществления изобретения один или несколько гетерологичных генов могут  
35 быть введены в клетку-хозяина любым известным способом, обеспечивающим нахождение гена вне хромосомы или встраивание в геном хозяина. (Термин "гетерологичный" означает, что данный ген отсутствует в клетке-хозяине, в которую он был введен, и что обычно данный ген не встречается в таком хозяине. То есть, даже если микроорганизм-хозяин и источник гетерологичного гена обмениваются информацией, такой  
40 гетерологичный ген обычно не встречается в естественных клетках-хозяевах дикого типа. Термин "гетерологичный" обычно относится к разным видам животных, используемых в качестве хозяина и источника гена).

Можно использовать разные конструкции, которые включают системы репликации, полученные из плазмид, вирусов или центромеров, в комбинации с автономным  
45 реплицирующим сегментом (*ars*) для устойчивого сохранения. В тех случаях, когда необходима интеграция, можно использовать конструкции, которые способны обеспечить репликацию и являются транспозонами или обладают транспозоноподобной активностью введения либо характеризуются гомологией с геномом хозяина. Часто используют  
50 последовательности ДНК, содержащие гетерологичный ген между последовательностями, гомологичными последовательностям в геноме хозяина, находящимся в хромосоме или плазмиде. Желательно, чтобы гетерологичный ген присутствовал в нескольких копиях. См., например, патент США № 4399216. Таким образом, для введения гетерологичного гена можно использовать конъюгацию, трансдукцию, трансфекцию и трансформацию.

В вариантах осуществления изобретения, в которых использован внехромосомный элемент, конструкция ДНК предпочтительно включает маркер, позволяющий отбирать клетки-хозяева, содержащие данную конструкцию. Таким маркером обычно является маркер, устойчивый к биоцидам, например, устойчивый к антибиотикам или тяжелым металлам, обладающий комплементацией, характерной для прототрофии к ауксотрофному хозяину, или подобными свойствами. Системы репликации могут обладать особыми свойствами, такими как самопроизвольная репликация, могут включать клетки *cos* или характеризоваться другими специальными признаками.

Вместе с вышеуказанным гетерологичным геном можно использовать один или несколько гетерологичных генов, формирующих сигналы, регулирующие инициацию и терминацию транскрипции и трансляции, которые распознает клетка-хозяин. Однако в тех случаях, когда гетерологичный ген модифицирован, например, в результате удаления лидерной последовательности или введения последовательности, кодирующей зрелую форму цитокина и/или хемокина, где весь ген кодирует предшественник, часто необходимо изменить последовательность ДНК так, чтобы получить регуляторную последовательность инициации транскрипции, отличную от естественной последовательности.

Для разных хозяев существует целый ряд последовательностей инициации транскрипции. Такая последовательность может обеспечивать конститутивную экспрессию цитокина и/или хемокина или регулируемую экспрессию, которая может быть индуцирована химическим веществом, например, метаболитом, температурой или регулируемым репрессором. См., например, патент США № 4374927, который полностью включен в данное описание изобретения в качестве ссылки. Выбор промотора зависит от ряда факторов, таких как сила промотора, интерференция промотора в жизнедеятельность клеток, влияние на промотор регуляторных механизмов, являющихся эндогенными для данной клетки, и тому подобных. Можно получить большое число промоторов из разных источников, включая коммерческие источники.

Векторы, пригодные для экспрессии цитокинов, приведенных в таблицах 1, 8 и 9, хорошо известны специалистам в данной области. Аналогичным образом гетерологичные гены, кодирующие цитокины и хемокины, приведенные в таблицах 1, 8 и 9, хорошо известны специалистам в данной области, при этом кодирующие последовательности можно получить из разных источников, включающих разные базы данных, представленные в патентах, общедоступные базы данных (в частности, базы данных нуклеиновых кислот и белков, представленные в Национальной медицинской библиотеке или в Европейской лаборатории молекулярной биологии), которые содержат нуклеотидные или полипептидные последовательности, кодирующие вышеуказанные цитокины, хемокины или другие белки, научную литературу или научные публикации, приведенные в каталогах, публикуемых компаниями, такими как Genzyme, Inc., R&D Systems, Inc., или InvivoGen, Inc [см., например, каталоги Cytokine Research Products, 1995, Genzyme Diagnostics, Genzyme Corporation, Cambridge MA; 2002 or 1995 Catalog R&D Systems, Inc. (Minneapolis, MN); или 2002 Catalog of InvivoGen, Inc (San Diego, CA), которые полностью включены в данное описание изобретения в качестве ссылки, в том числе все приведенные в них ссылки]. Альтернативно, нуклеиновые кислоты, кодирующие цитокины и/или хемокины, и векторы, содержащие нуклеиновые кислоты, кодирующие цитокины и/или хемокины, можно приобрести у коммерческих поставщиков, таких как R&D Systems, Inc. (Minneapolis, MN 55413) или InvivoGen, Inc. (San Diego, CA 92121). В соответствии с некоторыми объектами данного изобретения бактериальные клетки модифицируют для экспрессии разных комбинаций цитокинов и/или хемокинов.

Бактериальные клетки, пригодные для использования в настоящем изобретении, включают прокариоты (грамположительные и грамотрицательные микроорганизмы) и низшие эукариоты, такие как грибы. Бактериальные клетки, пригодные для использования в настоящем изобретении, относятся к нижеследующим родам: 1) Enterobacteriaceae, включая виды родов *Escherichia*, *Erwinia*, *Shigella*, *Salmonella* и *Proteus*; 2)

Bacillaceae; 3) Rhizobiaceae, такой как Rhizobium; 4) Spirillaceae, такой как фотобактерии, Zymomonas, Serratia, Aeromonas, Vibrio, Desulfovibrio, Spirillum; 6) Lactobacillaceae; 7) Pseudomonadaceae, такой как Pseudomonas и Acetobacter; 8) Azotobacteraceae и Nitrobacteraceae. К низшим эукариотам относятся также грибы, такие как Phycomycetes и Ascomycetes, которые включают дрожжи, такие как Saccharomyces и Schizosaccharomyces; и дрожжи Basidiomycetes, такие как Rhodotorula, Aureobasidium, Sporobolomyces и тому подобные. После высокой экспрессии белков цитокина в трансформированных бактериальных клетках указанные клетки можно собрать известными способами и обработать фиксирующими реагентами для лизиса клеток и стабилизации активного цитокина. В некоторых вариантах осуществления изобретения цитокина и/или хемокины экспрессируют в клетках Pseudomonas fluorescens; после чего клетки фиксируют, собирают, промывают или необязательно промывают и затем фиксируют.

Клетку-хозяина, содержащую один или несколько гетерологичных генов, можно выращивать в любой известной питательной среде, в которой конструкция ДНК характеризуется селективным преимуществом (например, в избирательной среде, содержащей антибиотика), при условии, что в данной избирательной среде по существу все клетки сохраняют гетерологичные гены. Указанные клетки затем можно собрать известными способами и модифицировать вышеописанными методами. Альтернативно клетки можно сначала фиксировать и затем собирать.

Клетки ARC определяют в данном изобретении при помощи нижеследующих испытаний: А) Клетки ARC являются мертвыми. Указанные клетки не могут образовывать колонии на питательных средах, пригодных для роста их живых форм. В) Клетки ARC характеризуются повышенной физической долговечностью. Указанные клетки устойчивы к разрушению ультразвуком или обладают более высокой устойчивостью при прохождении через французский пресс по сравнению с неизменными живыми формами. С) Клетки ARC подвержены распаду в результате протеолиза. То, что данные клетки в большей степени подвержены протеолитическому распаду под действием трипсина (или целого ряда других протеаз) по сравнению с их неизменными живыми формами, можно определить при помощи микроскопии или других методов. D) Клетки ARC содержат рекомбинантные гетерологичные гены и экспрессируют гетерологичные белки, при этом требуемые функциональные свойства гетерологичных белков частично или полностью сохранены.

Разные методы инактивации и изменения клеток-хозяев предусматривают подкисление кислотами, такими как уксусная кислота, с добавлением или без добавления галогенирующего агента, такого как йод; ультрафиолетовое облучение; лиофилизацию; токсины, например, антибиотики; фенолы; анилиды, например, карбанилид и салициланилид; гидроксимочевину; четвертичные спирты; антибактериальные красители; EDTA и амидины; неспецифические органические и неорганические химические вещества, такие как вышеуказанные галогенирующие агенты, например, хлорирующие, бромлирующие или йодирующие агенты; альдегиды, например, глутаральдегид или формальдегид; токсичные газы, такие как озон и пероксид этиленоксида; псоралены; десиканты; или тому подобные, которые могут быть использованы отдельно или в комбинации. Выбор агента зависит от определенного цитокина или хемокина, характера клетки-хозяина и принципов модификации клеточной структуры, необходимой для достижения требуемых эффектов лизиса клеток, сохранения активности цитокинов, физического упрочнения клеточной оболочки и химической денатурации белков клеточной оболочки, в результате чего клетки становятся более чувствительными к протеолизу.

Приемлемые агенты, предназначенные для инактивации и изменения клеток с образованием ARC, включают галогенирующие агенты, в частности, галогены с атомными числами 17-80. В частности, можно использовать йод в мягких условиях и производить обработку в течение периода времени, достаточного для достижения требуемых результатов. Другие приемлемые методы предусматривают обработку альдегидами, такими как формальдегид и глутаральдегид, антибактериальными средствами, такими как хлорид зефирана и хлорид цетилпиридиния, спиртами, такими как изопропиловый спирт и

этанол, разными гистологическими фиксаторами, такими как фиксатор Боуина и фиксатор Гелли (см. Humason, Gretchen L., Animal Tissue Techniques, W.H. Freeman and Company, 1967); или комбинацией физических (тепловых) и химических агентов, которые увеличивают активность цитокина и/или хемокина.

5 При галогенировании йодом температура обычно находится в интервале от около 0°C до 50°C, но данную реакцию можно выполнять при комнатной температуре. Специалист в данной области может легко определить оптимальный диапазон переменных параметров с учетом активности или отсутствия активности цитокина, экспрессированного соответствующими клетками ARC. Другие подобные переменные специалист в данной области может протестировать без ненужного экспериментирования. Например, йодирование можно испытать при помощи трийодида или йода, вводимого в количестве 0,5-5% в кислую водную среду, в частности, в водный раствор карбоновой кислоты, который может изменяться в пределах около 0,5-5M. Можно также использовать уксусную кислоту или другие карбоновые кислоты, содержащие от около 1 до 4 атомов углерода. 15 Время реакции обычно составляет от менее минуты до около 24 часов, в частности, от около 1 до 6 часов; показатель pH растворов для галогенирования (например, йодирования) находится в пределах от около 4,0 до около 7,0. В некоторых вариантах осуществления изобретения показатель pH находится в пределах от около 4,0 до около 6,0, от около 4,0 до около 5,0, от около 4,1 до 4,7, от около 4,2 до 4,6, от около 20 4,3 до 4,4 или около 4,3. В других вариантах осуществления изобретения показатель pH находится в пределах от около 3,0 до около 6,0, от около 3,5 до около 5,0, от около 3,7 до 4,7, от около 3,8 до 4,6, от около 3,9 до 4,4 или около 4,3. Любой остаточный йод при необходимости можно удалить, осуществляя взаимодействие с восстановителем, таким как дитионит, тиосульфат натрия или другие восстановители. Кроме того, 25 модифицированные клетки могут быть подвергнуты дальнейшей обработке, такой как тщательная промывка, для удаления реакционной среды, выделения в сухом виде и смешивания с обычными связующими веществами, пластификаторами и адъювантами, обычно используемыми специалистами в данной области. В некоторых вариантах осуществления изобретения клетки ARC могут быть получены путем обработки перекрестносшивающими агентами, известными в данной области. 30

Один из способов изменения клеток, в частности, фиксация люголем, описан в ссылке [9] и патенте США № 4695455 (которые полностью включены в данное описание изобретения в качестве ссылки). Измененные клетки промывают водой и вводят в соответствующий препарат для использования в терапевтических целях. В соответствии с 35 данным аспектом изобретения получают композиции, содержащие измененные микроорганизмы, которые можно вводить нуждающемуся субъекту в количествах, достаточных для достижения требуемого биологического эффекта. Указанные композиции можно получить с использованием любых носителей, включая, например, носители, описанные в публикации E.W. Martin's Remington's Pharmaceutical Science, Mack 40 Publishing Company, Easton, PA.

Настоящее изобретение относится к способам индукции и/или ускорения иммунной реакции у субъекта, которые предусматривают стадии введения субъекту (такому как птица, амфибия, рептилия, водное панцирное животное, рыба или млекопитающее) композиции, содержащей измененные рекомбинантные клетки (ARC), экспрессирующие 45 цитокин/хемокин, один или несколько представляющих интерес антигенов и, необязательно, дополнительные молекулы адъювантов, такие как липополисахарид (LPS) или динуклеотид CpG в количестве, достаточном для возбуждения иммунной реакции. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления изобретения клетки ARC коэкспрессируют: а) один или несколько представляющих интерес антигенов и б) один или 50 несколько цитокинов/хемокинов, таких как IFN- $\gamma$  или другие цитокины/хемокины, приведенные в таблицах 1, 8 и 9. В других вариантах осуществления изобретения нуждающемуся субъекту вводят композицию, содержащую смесь одного или нескольких антигенов и клеток ARC, экспрессирующих один или несколько цитокинов/хемокинов. В

смешанной композиции используют нижеследующие антигены: 1) в очищенном виде, 2) в виде неочищенного экстракта и/или 3) в отдельной композиции ARC, в которой клетки трансформированы ДНК, кодирующей представляющий интерес антиген. В любом варианте осуществления изобретения композиция может необязательно содержать адъюванты, известные специалистам в данной области. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления изобретения клетки ARC коэкспрессируют по крайней мере IFN- $\gamma$  и IFN- $\alpha$ .

Другим аспектом настоящего изобретения являются способы ускорения иммунной реакции у субъекта, которые предусматривают введение нуждающемуся субъекту измененных рекомбинантных клеток (ARC), содержащих один или несколько цитокинов и/или хемокинов или их композиции, в количествах, достаточных для ускорения иммунной реакции у указанного субъекта. В соответствии с одним аспектом изобретения возникновение максимальной гуморальной иммунной реакции (например, появление максимального числа антител IgM- и/или IgG-классов после антигенной стимуляции) у субъекта можно ускорить на 1-14 дней или больше. В соответствии с данным аспектом изобретения субъект может быть предварительно подвергнут воздействию антигена, либо указанный антиген может быть введен субъекту одновременно с вышеуказанной композицией.

Таким образом, настоящее изобретение относится к способам ускорения образования у субъекта изотипов антитела (например, IgG1 и IgG2) или разных классов антител (например, IGM, IgG, IgA, IgE и/или IgY), которые включают введение композиций, включающих клетки ARC, содержащие один или несколько цитокинов и/или хемокинов. Указанный способ может далее включать введение антигена или иммуногена до, одновременно или после введения композиции ARC. В некоторых вариантах осуществления изобретения композиция ARC представляет собой IFN- $\gamma$ /ARC. Другие варианты осуществления изобретения относятся к клеткам ARC, содержащим IFN- $\alpha$  и IFN- $\gamma$ . В разных вариантах осуществления изобретения гены интерферона принадлежат человеку, птицам (например, цыплятам), крупному рогатому скоту, млекопитающим или рыбе.

В некоторых вариантах осуществления изобретения клетки ARC, экспрессирующие один или несколько цитокинов и/или хемокинов, вводят нуждающемуся субъекту в период времени от двух до ста часов и через шестьдесят восемь часов после стимуляции представляющим интерес антигеном. Термин "представляющий интерес антиген" означает, не ограничиваясь ими, аутоантигены, опухолевые антигены, тривакцины против кори, эпидемического паротита и краснухи, полиомиелитные вакцины, противостолбнячные вакцины, патогены, обычно присутствующие в окружающей среде (например, пищевые патогены, такие как виды *Klebsiella*, *Salmonella*, *Escherichia*, вирусы гепатита, вирусы гриппа и т.д.) и патогенные вещества, намеренно вводимые в среду, окружающую субъекта, такие как биотоксин (например, микотоксины, такие как трихотеценовый микотоксин (Т-2), стафилококковый энтеротоксин В, рицин или нейротоксин *Clostridium botulinum*, "вооруженные" бактериальные клетки (например, вирусы, содержащие ДНК- или РНК-вставки токсина, либо бактериальные или грибные клетки, трансформированные токсинами [например, микотоксины, такие как трихотеценовый микотоксин (Т-2), стафилококковый энтеротоксин В, рицин или нейротоксин *Clostridium botulinum*], вирусные патогены, грибные патогены, бактериальные патогены (например, вирус оспы, вирус сибирской язвы, вирус Эбола, *Yersinia pestis*), иммуномодуляторные белки, такие как суперантигены, сывороточные альбумины или белковые стабилизаторы. Таким образом, настоящее изобретение относится а) к лечению субъекта, подвергшегося воздействию биологического агента, используемого при совершении террористического акта с применением биологического оружия, и б) к лечению субъекта, подвергшегося воздействию патогена, обычно присутствующего в окружающей среде. В предпочтительных вариантах осуществления изобретения, относящихся к данному аспекту, клетки ARC коэкспрессируют IFN- $\gamma$  и/или IFN- $\alpha$  и, необязательно, LPS. Клетки ARC, необязательно,

коэкспрессируют другие белки, цитокины и/или хемокины помимо IFN- $\gamma$  и IFN- $\alpha$ .

Настоящее изобретение относится также к способам лечения опухолей, рака или злокачественных новообразований, которые предусматривают введение субъекту измененных рекомбинантных клеток (ARC), содержащих один или несколько цитокинов и/или хемокинов или их композиции в количествах, достаточных для оказания терапевтического эффекта. В некоторых вариантах осуществления изобретения термин "лечение" и/или "терапевтический эффект" означает любой процесс, действие, применение, терапию или тому подобные, при выполнении которых субъекту оказывают медицинскую помощь с использованием объекта, улучшающего состояние здоровья, качество жизни или прогноз болезни у данного субъекта. В других вариантах осуществления изобретения термин "лечение" или "терапевтический эффект" означает также предоставление субъекту лечения, в результате которого уменьшается масса опухоли, сокращается число раковых клеток или происходит ремиссия подвергнутой лечению опухоли, рака или злокачественного новообразования.

Настоящее изобретение относится к способам стимуляции, супрессии или модуляции иммунной системы субъекта, которые включают введение композиций, включающих измененные бактериальные клетки (ARC), содержащие цитокины и/или хемокины (например, приведенные в таблицах 1, 8 и 9), экспрессированные способами по данному изобретению. Один конкретный вариант осуществления изобретения относится к способу активации или стимуляции макрофага у субъекта, который предусматривает введение клеток ARC, содержащих один или несколько гетерологичных генов в количествах, достаточных для активации или стимуляции макрофага. В конкретном варианте осуществления изобретения клетки ARC содержат гетерологичные гены, кодирующие IFN- $\gamma$  и, необязательно, IFN- $\alpha$ .

Настоящее изобретение относится также к способам усиления сопротивляемости организма субъекта вирусной инфекции, которые предусматривают введение композиций, включающих измененные рекомбинантные бактериальные клетки (ARC), содержащие цитокины и/или хемокины, экспрессированные способами по данному изобретению. В некоторых вариантах осуществления изобретения измененные бактериальные клетки содержат такие цитокины как IFN- $\gamma$ . В других вариантах осуществления изобретения композиции содержат цитокины и/или хемокины, модулирующие требуемое биологическое действие. Такие композиции вводят в количествах, достаточных для стимуляции, супрессии или модуляции требуемого биологического действия (например, антивирусной активности или другой активности, представленной в таблицах 1, 8 или 9). Таким образом, настоящее изобретение относится также к способам индукции требуемых биологических действий, указанных в таблицах 1, 8 и 9, которые предусматривают введение композиций ARC (например, клеток ARC, содержащих гетерологичные гены, кодирующие цитокины и/или хемокины, вызывающие требуемое биологическое действие) в количествах, достаточных для индукции требуемого биологического действия.

Настоящее изобретение относится также к способам индукции по крайней мере одного требуемого биологического действия у млекопитающего, которые включают введение клеток ARC, содержащих один или несколько гетерологичных генов, или композиций ARC в количествах, достаточных для индукции требуемого биологического действия.

Биологические действия приведенных в качестве примеров цитокинов и/или хемокинов известны специалистам в данной области, и неограничивающие примеры биологических действий, опосредуемых разными цитокинами и/или хемокинами, приведены в таблицах 8-9.

Настоящее изобретение относится также к способам, пригодным для применения в медицине и ветеринарии. Термин "субъект" означает рыбу, птиц, млекопитающих и/или рептилий. Млекопитающие, в отношении которых вышеописанные способы могут оказать благоприятный эффект, включают, не ограничиваясь ими, такие виды как человекообразные обезьяны, шимпанзе, орангутаны, человек, мартышки; домашние животные, такие как собаки, кошки, морские свинки, хомячки, вьетнамские свинки,

кролики и хорьки; сельскохозяйственные животные, такие как коровы, буйволы, зубры, лошади, ослы, свиньи, овцы и козы; экзотические животные, обычно содержащиеся в зоопарках, такие как медведи, львы, тигры, пантеры, слоны, гиппопотамы, носороги, жирафы, антилопы, ленивцы, газели, зебры, гну, луговые собачки, коалы, кенгуру, опоссумы, еноты, панды, большие панды, гиены, тюлени, морские львы и морские слоны. Рептилии включают, не ограничиваясь ими, такие виды как аллигаторы, крокодилы, сухопутные черепахи, морские черепахи, змеи, игуаны и/или другие ящерицы. Птицы включают, не ограничиваясь ими, такие виды как куры, индейки, голуби, куропатки, попугаи, ара, горлицы, гвинейские куры, неразлучники, попугайчики, фламинго, орлы, ястребы, соколы, кондоры, страусы, павлины, утки и лебеди. Рыбы включают, не ограничиваясь ими, такие виды как головоногие моллюски, кальмары, угорь, осьминоги, треска, тунец, лосось, хек, скаты, форель, пикша, палтус, камбала, сельдь, иглобрюхие, скалозубые, щука, группер, белокорый палтус, карп, окунь, луна-рыба, тилапия, кошачий сом, серебряный карась, голянь, кои, морской окунь, скумбрия, самец лосося, пирания, морской ангел, рыба-клоун, удильщик, налим, летучая рыба, меч-рыба, прилипала, минога, манта, морской кот, электрический скат, салака, гуппи, колюшка, мерланг, черный окунь, голавль, морской дракончик, батиптеровые, корюшка, морская собачка, шпрот, двоякодышащая рыба, илистый прыгун, латимерия, лиманда, морской язык, пелотрета, бриль, скорпена, берикс, тригла, сайда, удильщиковые, рыба-попугай, спинорог, зеленая тетра, барракуда, бородавчатковые, скорпеновые, губан, линь, плотва, марлин, пила-рыба, парусник, голубой тунец, анчоус, осетр, голец, ремора, кефаль, ромбосолея, баррамунда, бойцовая рыбка, панцирная рыба, морская игла, морской ерш, конгер, муреновые, судак, полосатая перцина, барабулька, сардина, сиг, рыба-лоцман, бычок, рыба-присоска, морской дьявол, солнечник. В данную категорию также входят акулы, которые включают, не ограничиваясь ими, такие виды как серо-голубая акула, белая акула, акула-молот, синяя акула, лисья акула, ковровая акула, острозубая акула, рифовая акула, серая акула, шестижаберная акула, песчаная акула, усатая акула-нянька, китовая акула, гигантская акула, кошачья акула, тигровая акула, сельдевая акула, большеротая акула, суповая акула, морской ангел, пряморотая акула, светящаяся черная акула, головастая акула, колючая акула, скапаноринх, тигровая песчаная акула, длиннорылая акула, черная акула, бурая акула, бычья акула, молотоголовая акула, коричневая акула, бородатая акула, плащеносная акула, галапагосская акула, ложнопесчаная акула, скапаноринховые, обыкновенная кунья акула, круглорылая акула, пилоносая акула, семижаберная акула, короткохвостая акула, замбезийская акула, акула Порт-Джексона, узкозубая акула. Неограничивающие примеры рептилий, пригодных для осуществления настоящего изобретения, включают, не ограничиваясь ими, такие виды как крокодилы, аллигаторы, змеи, лягушки и черепахи (такие как каймановые черепахи и морские черепахи).

Дополнительные рептилии и/или рыбы включают виды, представленные в нижеследующих публикациях the Regulatory Fish Encyclopedia, U.S. Food & Drug Administration, Seafood Products Research Center, Center for Food Safety & Applied Nutrition; The 2001 Seafood List, U.S. Food & Drug Administration, Center for Food Safety & Applied Nutrition; Catalog of Fishes, William N. Eschmeyer, Ed., California Academy of Sciences, San Francisco, 1998; and the Encyclopedia Of Reptiles & Amphibians, Second edition, Harold G. Cogger and Richard G. Zweifel (Editors), 1998, Academic Press, San Diego, CA. Все вышеуказанные перечни рептилий и рыб полностью включены в данное описание изобретения в качестве ссылки.

В разных вариантах осуществления изобретения композиции по данному изобретению можно вводить перорально, парентерально, в виде распыляемых растворов (включая аэрозоли), местно, ректально, назально, трансбуккально, вагинально или при помощи имплантируемого резервуара. Термин "парентеральный" в используемом здесь значении означает подкожное, внутрикожное, внутривенное, внутривенное, внутримышечное, внутрибрюшинное, внутрибололочное, внутрижелудочковое, внутригрудинное или

внутричерепное введение при помощи инъекций и вливания.

Таким образом, настоящее изобретение можно применять для лечения транспортной лихорадки у животных (таких как коровы) или для защиты новорожденных телят от вирусных болезней и/или бактериального гастроэнтерита. Данный способ применим также  
 5 для ослабления вызванных стрессом заболеваний у животных и человека, а также для усиления иммунной реакции при использовании в качестве адъюванта для пероральной, внутримышечной и подкожной вакцинации человека. Во всех вариантах осуществления изобретения выделенные клетки ARC или композиции ARC, содержащие один или несколько цитокинов и/или хемокинов, вводят в количествах, достаточных для ослабления  
 10 тяжести заболевания или симптомов заболевания и/или предотвращения возникновения заболевания или появления симптомов заболевания. В некоторых вариантах осуществления изобретения клетки ARC содержат IFN- $\gamma$ .

Таким образом, в объем настоящего изобретения входит ряд неограничивающих вариантов его осуществления и объектов, которые включают:

15 А) Измененная рекомбинантная клетка (ARC), содержащая один или несколько гетерологичных генов, кодирующих хемокин и/или цитокин.

В) Клетка ARC, соответствующая варианту осуществления изобретения А, в которой один или несколько гетерологичных генов кодируют IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-15, IL-16, IL-18, IL-23, IL-24, эритропоэтин, G-  
 20 CSF, M-CSF, тромбоцитарный фактор роста (PDGF), MSF, лиганд FLT-3, EGF, фактор роста фибробластов (FGF, например, aFGF (FGF-1), bFGF (FGF-2), FGF-3, FGF-4, FGF-5, FGF-6 или FGF-7), инсулиноподобные факторы роста (например, IGF-1, IGF-2), эндотелиальный фактор роста сосудов (VEGF); интерфероны (например, IFN- $\gamma$ , IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ ); фактор ингибирования лейкоза (LIF); мерцательный нейротрофический фактор (CNTF); онкостатин  
 25 М; фактор самоподдержания стволовых клеток (SCF); трансформирующие факторы роста (например, TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, TGF- $\beta$ 3) или хемокины (которые включают, не ограничиваясь ими, BCA-1/BLC-1, BRAK/Кес, CXCL16, CXCR3, ENA-78/LIX, зотаксин-1, зотаксин-2/MPIF-2, эксодус-2/SLC, фракталкин/нейротактин, GROальфа/MGSA, HCC-1, I-TAC, лимфотактин/ATAC/SCM, MCP-1/MCAF, MCP-3, MCP-4, MDC/STCP-1, ABCD-1,  
 30 MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , MIP-2 $\alpha$ /GRO $\beta$ , MIP-3 $\alpha$ /эксодус/LARC, MIP-3 $\beta$ /эксодус-3/ELC, MIP-4/PARC/DC-CK1, PF-4, RANTES, SDF1 $\alpha$ , TARC или TECK) либо цитокины и/или хемокины, приведенные в таблицах 1, 8 и 9.

С) Клетка ARC, соответствующая любому вышеописанному варианту осуществления изобретения, в которой гетерологичный ген кодирует IFN- $\gamma$  (например, бычий, птичий (в частности, куриный), рыбий или человеческий IFN- $\gamma$ ).

Д) Клетка ARC, соответствующая любому вышеописанному варианту осуществления изобретения, которая далее содержит гетерологичный ген, кодирующий IFN- $\alpha$  (например, бычий, птичий (в частности, куриный), рыбий или человеческий IFN- $\alpha$ ).

40 Е) Клетка ARC, соответствующая любому вышеописанному варианту осуществления изобретения, которая далее содержит один или несколько гетерологичных генов, кодирующих аутоантигены, опухолевые антигены, тривакцины против кори, эпидемического паротита и краснухи (MMR), полиомиелитные вакцины, противостолбнячные вакцины, антигены, связанные с патогенами, обычно присутствующими в окружающей среде  
 45 (например, пищевые патогены, такие как виды *Klebsiella*, *Salmonella*, *Escherichia*, вирусы гепатита, вирусы гриппа и т.д.), патогенные вещества или антигены, которые могут быть намеренно введены в среду, окружающую субъекта, такие как биотоксин (например, микотоксины, такие как трихотеценовый микотоксин (Т-2), стафилококковый энтеротоксин В, рицин или нейротоксин *Clostridium botulinum*, антигены, связанные с  
 50 "вооруженными" бактериальными клетками (например, вирусы, содержащие ДНК- или РНК-вставки токсина, бактериальные или грибные клетки, трансформированные токсинами [например, микотоксины, такие как трихотеценовый микотоксин (Т-2), стафилококковый энтеротоксин В, рицин или нейротоксин *Clostridium botulinum*], вирусные патогены или

их антигены, грибные патогены или их антигены, бактериальные патогены или их антигены (например, вирус оспы, вирус сибирской язвы, вирус Эбола, *Yersinia pestis*), иммуномодуляторные белки, такие как суперантигены, сывороточные альбумины или белковые стабилизаторы.

5 F) Клетка ARC, соответствующая любому вышеописанному варианту осуществления изобретения, которая содержит один гетерологичный ген (например, один цитокин, хемокин или белок).

G) Клетка ARC, соответствующая любому вышеописанному варианту осуществления изобретения, в которой один или несколько гетерологичных генов находятся в единичном  
10 векторе.

H) Клетка ARC, соответствующая вариантам осуществления изобретения A-F, в которой гетерологичные гены находятся в нескольких векторах.

I) Клетка ARC, соответствующая любому вышеописанному варианту осуществления изобретения, которая является грамположительной, грамотрицательной бактериальной  
15 клеткой или низшим эукариотом, таким как грибы.

J) Клетка ARC, соответствующая любому вышеописанному варианту осуществления изобретения, которая представляет собой: а) бактерии родов: 1) *Enterobacteriaceae*, включая виды родов *Escherichia*, *Erwinia*, *Shigella*, *Salmonella* и *Proteus*; 2) *Bacillaceae*; 3) *Rhizobiaceae*, такие как *Rhizobium*; 4) *Spirillaceae*, такие как  
20 фотобактерии, *Zymomonas Serratia*, *Aeromonas*, *Vibrio*, *Desulfovibrio*, *Spirillum*; 6) *Lactobacillaceae*; 7) *Pseudomonadaceae*, такие как *Pseudomonas* и *Acetobacter*; 8) *Azotobacteraceae* и *Nitrobacteraceae*; или б) низшие эукариоты или грибы, такие как *Phycomycetes* и *Ascomycetes*, которые включают дрожжи, такие как *Saccharomyces* и *Schizosaccharomyces*, и дрожжи *Basidiomycetes*, такие как *Rhodotorula*, *Aureobasidium*,  
25 *Sporobolomyces*.

K) Клетка ARC, соответствующая вариантам осуществления изобретения A-J, которая является бактериальной клеткой *Pseudomonas fluorescens*.

L) Композиция, включающая клетку ARC, содержащую один или несколько гетерологичных генов, кодирующих хемокин и/или цитокин по любому вышеописанному  
30 варианту осуществления изобретения, и носитель.

M) Способ индукции и/или ускорения иммунной реакции на антиген или иммуноген, который предусматривает стадии введения нуждающемуся субъекту (такому как птица, амфибия, рептилия, водное панцирное животное, рыба или млекопитающее):

а) измененной рекомбинантной клетки (ARC), содержащей один или несколько  
35 гетерологичных генов, кодирующих хемокин и/или цитокин;

б) композиции, включающей измененные рекомбинантные клетки (ARC), содержащие один или несколько гетерологичных генов, кодирующих хемокин и/или цитокин;

с) клетки ARC, соответствующей вариантам осуществления изобретения A-L;

д) необязательно, представляющего интерес антигена;

40 е) необязательно, липополисахарида (LPS) в количестве, достаточном для возбуждения иммунной реакции.

N) Способ, соответствующий варианту осуществления изобретения M, в котором клетки ARC коэкспрессируют: а) один или несколько представляющих интерес антигенов и б) один или несколько цитокинов/хемокинов, таких как IFN- $\gamma$  или другие цитокины/хемокины,  
45 приведенные в таблицах 1, 8 и 9.

O) Способ ускорения иммунной реакции на антиген или иммуноген, который предусматривает введение субъекту:

а) измененной рекомбинантной клетки (ARC), содержащей один или несколько гетерологичных генов, кодирующих хемокин и/или цитокин;

50 б) композиции, включающей измененные рекомбинантные клетки (ARC), содержащие один или несколько гетерологичных генов, кодирующих хемокин и/или цитокин; или

с) клетку ARC, соответствующую вариантам осуществления изобретения A-L;

в количествах, достаточных для ускорения иммунной реакции у нуждающегося субъекта.

P) Способ ускорения образования антител, относящихся к разным классам и подклассам (например, IgM, IgG, IgA и/или IgE) и специфичных к антигену или иммуногену, который предусматривает введение субъекту:

- а) измененной рекомбинантной клетки (ARC), содержащей один или несколько гетерологичных генов, кодирующих хемокин и/или цитокин;
- б) композиции, включающей измененные рекомбинантные клетки (ARC), содержащие один или несколько гетерологичных генов, кодирующих хемокин и/или цитокин; или
- в) клетки ARC, соответствующей вариантам осуществления изобретения A-L; в количествах, достаточных для ускорения образования антител определенного класса у нуждающегося субъекта.

Q) Способ, соответствующий вариантам осуществления изобретения M-P, который далее предусматривает введение антигена или иммуногена до, одновременно или после введения композиции ARC.

R) Способ, соответствующий вариантам осуществления изобретения M-Q, в котором клетка ARC или композиция ARC содержит IFN- $\gamma$ .

S) Способ, соответствующий вариантам осуществления изобретения M-Q, в котором клетка ARC или композиция ARC содержит IFN- $\alpha$  и IFN- $\gamma$ .

T) Способ, соответствующий вариантам осуществления изобретения R-S, в котором IFN- $\gamma$  является человеческим, птичьим (например, куриным), бычьим или рыбьим гамма-интерфероном.

U) Способ, соответствующий вариантам осуществления изобретения R-S, в котором IFN- $\alpha$  и IFN- $\gamma$  являются человеческими, птичьими (например, куриными), бычьими или рыбьими интерферонами.

V) Способ, соответствующий вариантам осуществления изобретения M-U, в котором клетку ARC или композицию ARC, экспрессирующую один или несколько цитокинов и/или хемокинов, вводят субъекту в период времени от двух до ста часов и через шестьдесят восемь часов после стимуляции антигеном или иммуногеном.

W) Способ, соответствующий вариантам осуществления изобретения M-V, в котором антиген или иммуноген представляет собой патоген, обычно присутствующий в окружающей среде, или патогенные вещества, намеренно вводимые в среду, окружающую субъекта.

X) Способ, соответствующий вариантам осуществления изобретения M-W, в котором антиген или иммуноген выбирают из группы, включающей аутоантигены, опухолевые антигены, тривакцины против кори, эпидемического паротита и краснухи (MMR), полиомиелитные вакцины, противостолбнячные вакцины, патогены или их антигены, обычно присутствующие в окружающей среде (например, пищевые патогены, такие как виды *Klebsiella*, *Salmonella*, *Escherichia*, вирусы гепатита, вирусы гриппа и т.д.), патогенные вещества или их антигены, которые могут быть намеренно введены в среду, окружающую субъекта, такие как биотоксин (например, микотоксины, такие как трихотеценовый микотоксин (Т-2), стафилококковый энтеротоксин В, рицин или нейротоксин *Clostridium botulinum*, "вооруженные" бактериальные клетки или их антигены (например, вирусы, содержащие ДНК- или РНК-вставки токсина, бактериальные или грибные клетки, трансформированные токсинами [например, микотоксины, такие как трихотеценовый микотоксин (Т-2), стафилококковый энтеротоксин В, рицин или нейротоксин *Clostridium botulinum*], вирусные патогены или их антигены, грибные патогены или их антигены, бактериальные патогены или их антигены (например, вирус оспы, вирус сибирской язвы, вирус Эбола, *Yersinia pestis*), иммуномодуляторные белки, такие как суперантигены, сывороточные альбумины или белковые стабилизаторы.

Y) Способ, соответствующий вариантам осуществления изобретения M-X, в котором клетка ARC или композиция ARC содержит IFN- $\gamma$ , необязательно IFN- $\alpha$  и необязательно LPS.

Z) Способ, соответствующий вариантам осуществления изобретения M-Y, в котором клетка ARC или композиция ARC также содержит другие белки, цитокины и/или хемокины



нескольких гетерологичных генов. Клетки можно выращивать в любой известной питательной среде, в которой конструкция ДНК характеризуется селективным преимуществом (например, выращивание в избирательной среде, содержащей антибиотики), при условии, что в данной избирательной среде по существу все клетки сохраняют гетерологичные гены. Указанные клетки затем можно собрать известными способами и модифицировать вышеописанными методами. Альтернативно клетки можно сначала фиксировать и затем собрать.

JJ) В соответствии с одним аспектом варианта осуществления изобретения II можно использовать разные методы инактивации и изменения клеток-хозяев, которые предусматривают подкисление кислотами, такими как уксусная кислота, с добавлением или без добавления галогена, такого как йод; ультрафиолетовое облучение; лиофилизацию; токсины, например, антибиотики; фенолы; анилиды, например, карбанилид и салициланилид; гидроксимочевину; четвертичные спирты; антибактериальные красители; EDTA и амидины; неспецифические органические и неорганические химические вещества, такие как галогенирующие агенты, например, хлорирующие, бромирующие или йодирующие агенты; альдегиды, например, глутаральдегид или формальдегид; токсичные газы, такие как озон и пероксид этиленоксида; псоралены; десиканты; или тому подобные, которые могут быть использованы отдельно или в комбинации. Альтернативно можно использовать способы, рассмотренные в приведенных выше абзацах 31, 32, 33 и/или 34. Композиции могут быть также получены с использованием носителей, включающих, например, носители, описанные в публикации E.W Martin's Remington's Pharmaceutical Science, Mack Publishing Company, Easton, PA.

Термины "содержащий" и "содержащий в основном" имеют обычные значения. Указанные термины являются взаимозаменяемыми в данной заявке, сообщая конкретное значение, присущее каждому термину. Аналогичным образом используемый в данной заявке термин "около" может быть заменен фразой "по крайней мере около", и термин "содержащий" может быть заменен термином "включающий".

Ниже приведены примеры, иллюстрирующие способы осуществления данного изобретения. Приведенные примеры не ограничивают объем изобретения и включают разные варианты осуществления настоящего изобретения. За исключением особо оговоренных случаев соотношения компонентов растворяющей смеси выражены в объемном отношении и проценты выражены в массовых процентах.

#### Пример 1. Клетки-хозяева *Pseudomonas fluorescens* и экспрессирующие системы

В экспериментах по трансформации был использован продуцирующий штамм MB324 и в экспериментах по субклонированию была использована плазмида pMYC1803 (фиг.1). Вставку VuiVui вектора, полученного из вида *Bacillus thuringiensis*, вырезали рестрикционными ферментами SpeI и XhoI, после чего в указанный вектор вводили ген бычьего IFN- $\gamma$  (BGI) или ген куриного IFN- $\gamma$  (CGI). Опубликованные нуклеотидные последовательности BGI (фиг.2) и CGI были получены из банка генов GenBank при помощи программного обеспечения SeqWeb. Синтезируемую последовательность модифицировали путем удаления сигнальной последовательности и введения рибосома-связывающих сайтов рестрикции SpeI и XhoI. Информация о полученной последовательности была отправлена в компанию Operon Technologies для синтеза гена. Клонированный ген был секвенирован при помощи секвенатора P.E. 377 и подвергнут анализу при помощи программного обеспечения Factura и AutoAssembler. Верхняя и нижняя затравки, использованные для секвенирования, были созданы в компании Genosys.

#### Пример 2. Субклонение генов интерферона

Конические пробирки (50 мл), содержащие 5 мл L-бульона (LB), инокулировали охлаждаемыми льдом биочипами, полученными из замороженных в глицерине чистых культур *P. fluorescens* MB324. Культуры инкубировали в ротационном шейкере, вращающемся со скоростью 300 оборотов/мин, в течение ночи при 30°C. Для инокуляции 50 мл LB в 250-мл колбах с боковыми перегородками использовали по 0,75 мл каждой культуры. Культуры встряхивали в течение двух часов со скоростью 300 оборотов/мин при

30°C и выращивали до значения A600 (оптическая плотность при 600 нМ), равного 0,2-0,3. Затем культуры охлаждали на льду и осаждали центрифугированием со скоростью 3000 оборотов/мин. Осажденное вещество трижды промывали холодной стерильной, дистиллированной водой и осадок вторично суспендировали в воде.

5 Суспензии клеток (около 100 мкл каждая) вводили в кюветы для электропорации, смешивали с 10 мкл гена интерферона или смесей для контрольного лигирования; вторично суспендированные клетки электропорировали при помощи устройства GenePulser компании BioRad в 0,2 см кюветах при 200 Ом, 25 мкФ и 2,25 кВ и подвергали импульсной обработке при временных константах в интервале от 4,6 до 4,8.

10 К каждому образцу добавляли 1 мл LB и полученную жидкость переносили в охлаждаемые льдом пробирки Falcon 2059. Пробирки закрывали крышками и встряхивали в течение двух часов со скоростью 280 оборотов/мин при 30°C. Аликвоты образцов в количестве 100-200 мкл помещали на агар (30 мкг/мл), содержащий L-бульон и тетрациклин (LB-тетрациклин), и инкубировали при 30°C в течение ночи. Произвольно  
15 отбирали одну колонию из каждых двух 100 мкл посевов и две колонии из 200 мкл посева и использовали для инокуляции 50-мл конических пробирок, содержащих бульон LB-тетрациклин, вышеописанным способом. Образцы полученных культур смешивали со стерильным глицерином (1,0 мл культуры плюс 0,25 мл 75% глицерина) и хранили при -70°C. Остальную культуру (1,8 мл) центрифугировали в течение 10 минут в 2-мл  
20 пробирке Eppendorf. Осадки вторично суспендировали в 0,5 мл раствора P1 Qiagen, после чего шесть раз осторожно переворачивали с 0,5 мл раствора P2.

В течение примерно пяти минут образец снова переворачивали шесть раз с раствором N3 и охлаждали льдом. Охлажденный образец центрифугировали в течение десяти минут, осторожно отделяли от осадка и поверхностной пены и полученную жидкость супернатанта  
25 (примерно 1,5 мл) переносили в чистую пробирку Eppendorf. Затем образец очищали в центрифужной колонке Qiagen с использованием пробирки для сбора вещества, для чего весь 1,5 мл образец вводили на 30 секунд в колонку с двумя центрифугами, вмещающими примерно 0,7-0,8 мл аликвоты и вращающимися со скоростью 14000 оборотов/мин. Центрифужную колонку промывали 0,62 мл раствора PB Qiagen и 0,85 раствора PE,  
30 выполняя окончательное центрифугирование в течение 90 секунд. Содержимое колонки переносили в чистую пробирку Eppendorf, элюировали 50 мкл трис-буфера с EDTA в течение 1 минуты и центрифугировали со скоростью 14000 оборотов/мин в течение одной минуты. Элюент переносили в чистую пробирку Eppendorf и хранили при -20°C.

35 Полученные минипрепараты гидролизovali XhoI и SpeI и анализировали методом электрофореза в агарозном геле.

### Пример 3. Экспрессия и количественное определение белка интерферона

С учетом результатов, полученных для минипрепаратов, отбирали один клон MR324 со вставкой IFN- $\gamma$  для анализа экспрессии. Штаммы MR843 и MR837 *P. fluorescens*  
40 использовали в качестве интерферон-отрицательных контрольных образцов. Содержимое колб с посевом LB-тетрациклин выращивали до значения A600, равного 0,15-0,5, и нормализовали до 0,15 для 2% разведения в 1-литровых встряхиваемых колбах, содержащих 200 мл питательной среды с тетрациклином. Клетки *P. fluorescens* выращивали до значения A600, равного примерно 0,4, при 30°C и ротационном  
45 встряхивании в течение 24 часов. Клетки индуцировали 0,6 мл 100 мМ IPTG + 5 мл 40% MSG еще в течение 48 часов. Под микроскопом исследовали внешний вид клеток и образование внутриклеточных телец.

Отбирали 50 мл образцы и хранили при 4°C в конических пробирках для анализа экспрессии методом электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии  
50 додецилсульфата натрия (SDS-PAGE). В общей сложности 100 мкл культуры центрифугировали со скоростью 14000 оборотов/мин в течение пяти минут для осаждения клеток. Осадки вторично суспендировали в 100 мкл однократного буфера Лэммли и кипятили в течение 3 минут, причем образцы супернатанта до кипячения разводили в

отношении 1:1 буфером Лэммли. Десять мкл кипяченого образца смешивали с 30 мкл свежего буфера Лэммли и кипятили еще 3 минуты. Препараты замораживали в течение ночи, оттаивали на следующий день, нагревали до 70°C в течение пяти минут, вводили в лунки (по 10 мкл в каждую) 12-рядного планшета, содержащие 15% геля BioRad, и  
 5 разделяли электрофорезом с использованием буфера BioRad. Электрофорез выполняли в течение 20 минут при 50 В и затем в течение 1 часа 20 минут при 75 В. После разделения гели промывали в дистиллированной воде три раза по пять минут и окрашивали красителем BioSafe компании BioRad в течение 1,5 часов. Окрашенные гели обесцвечивали в дистиллированной воде, которую заменяли один раз через один час.  
 10 Количественное определение производили в денситометре MD, сравнивая интенсивность окрашивания образцов кумассии голубым с интерферон-отрицательными контрольными образцами и эталоном белка BSA.

Замена гена токсина VuiVui геном BGI на сайтах SpeI и XhoI вектора pMYC1803 была произведена без каких-либо осложнений (фиг.1). Аналогичные результаты были получены  
 15 для субклонирования гена CGI. Все отобранные трансформанты содержали вставку требуемого интерферона, что было сначала проверено электрофорезом в агарозном геле, а затем секвенированием встроенной ДНК (фиг.2). Для дальнейшего исследования был отобран один клон DnaK, чаперонин-содержащий штамм MB324 *P. fluorescens*.

Главная полоса белка была обнаружена при молекулярной массе, ожидаемой для BGI и  
 20 CGI (см., например, фиг.3), и экспрессия BGI и CGI в *Pseudomonas* составила около 40% от общего клеточного белка. Идентичность главной полосы с подлинным BGI или CGI была подтверждена путем очистки белка, содержащегося в главной полосе, в сочетании с биоанализами очищенного продукта. В результате оптимизации экспрессии и ферментации с высокой плотностью, достигаемой при использовании *Pseudomonas*, при выполнении  
 25 одного производственного цикла ферментации можно получить интерферон в количестве более 1000 кг.

#### Пример 4. Анализ растворимости

Культуру *P. fluorescens* объемом 0,975 мл центрифугировали в микроцентрифуге со скоростью 14000 оборотов/мин в течение 5 минут. Жидкость супернатанта декантировали и  
 30 клетки вторично суспендировали в буфере для лизиса до исходного объема. [Буфер для лизиса: трис-буфер с HCl, 50 mM, конечное значение pH 7,5; NaCl, 200 mM; глицерин, 5% об./об.; EDTA, 20 mM; тритон X-100, 5% об./об.; и добавляемый последним DTT, 1 mM]. Микроцентрифужные пробирки с завинчивающимися крышками (2 мл) заполняли на 3/4 объема 0,1 мм стеклянными шариками, которые покрывали суспензией клеток. Пробирки  
 35 быстро встряхивали для перемешивания шариков и удаления пузырьков воздуха и заполняли до самого верха суспензией клеток. Пробирки закрывали крышками, герметизировали и на 60 секунд устанавливали в устройство для разбивания клеток минишариками, вращающееся со скоростью 5000 оборотов/мин. Образцы помещали на лед между циклами разбивания, которые повторяли 3-5 раз до лизиса примерно 90% клеток.  
 40 Лизис клеток контролировали при помощи микроскопа. Лизированные клетки объемом 0,025 мл отбирали пипеткой из каждой пробирки без шариков, вводили в новые микроцентрифужные пробирки и центрифугировали в течение 5 минут. Фракцию супернатанта осторожно переносили в другую пробирку, содержащую 0,075 мл LSB, и добавляли 0,100 мл LSB к фракции осадка. Фракции супернатанта и осадка вторично  
 45 суспендировали при помощи мешалки Vortex, пробирки закрывали крышками, помещали на баню с кипящей водой на пять минут и анализировали 0,005-0,010 мл аликвоты фракций методом SDS-PAGE. Растворимость белка BGI или CGI, экспрессированного в *Pseudomonas*, оценивали при помощи французского пресса или устройства для разбивания клеток минишариками BioSpec, при этом были получены одинаковые результаты.  
 50 Как показано на фиг.4, испытывали растворимость BGI в клетках *Pseudomonas*, при этом было установлено, что большая часть, если не весь BGI оставался в растворимой форме. Аналогичные результаты были получены для CGI. Для выполнения указанных анализов растворимости жизнеспособные неизмененные клетки *Pseudomonas* разбивали во

французском прессе (или в устройстве для разбивания клеток минишариками) и центрифугировали для отделения клеточного дебриса и любых внутриклеточных телец от растворимых белков. Гели с SDS, содержащие две указанные фракции, показали, что BGI оставался в растворимой части, в то время как BAI (бычий  $\alpha$ -интерферон), являющийся

5 маркером в данном примере, который был клонирован и экспрессирован в другом эксперименте, находился главным образом в нерастворимой фракции. Кроме того, в отличие от BGI (или CGI) BAI образовывал крупные включения в *Pseudomonas*, которые были хорошо видны под фазово-контрастным микроскопом.

Анализ методом SDS-PAGE культур *P. fluorescens*, содержащих BAI и BGI, которые были

10 лизированы при помощи французского пресса, показан на фиг.4. Клетки *Pseudomonas* разрушали во французском прессе и центрифугировали с ускорением 16000 g в течение пяти минут. Полосы 1-4, относящиеся к образцам супернатанта, показывают наличие одной главной полосы (примерно 17 кДа) растворимого BGI при отсутствии видимого BAI. Полосы

15 5-8, относящиеся к образцам осадка, показывают наличие главной полосы (примерно 18 кДа) нерастворимого BAI вместе с небольшими количествами загрязняющего растворимого BGI (нижняя полоса, примерно 17 кДа). Загрязнение, по-видимому, является следствием переливания фракции супернатанта и нелизирования клеток.

Пример 5. Способ получения измененной рекомбинантной клетки (ARC) *Pseudomonas*

Все вещества, использованные при выполнении данного способа, были тщательно

20 стерилизованы. Культуру *P. fluorescens* после окончания ферментации выливали в стерильный химический стакан, содержащий стерилизованную магнитную мешалку. Культуру медленно перемешивали, контролируя значение pH при помощи стерилизованного спиртом зонда для измерения pH. Затем в течение примерно 10 минут по каплям добавляли ледяную уксусную кислоту до достижения значения pH, равного

25 примерно 4,3. После титрования культуры примерно до pH 4,3 добавляли концентрированный йод люголь до 1% об./об. [Йод люголь: стерильная дистиллированная вода, 90 мл; KI, 10 г/100 мл; йод, 5 г/100 мл; ледяная уксусная кислота, 10 мл]. Раствор тщательно перемешивали и в стерильных условиях переносили в другой стерильный химический стакан, содержащий стерильную мешалку. Раствор закрывали и

30 перемешивали в течение одного часа при комнатной температуре. Клетки можно обрабатывать в течение более продолжительных периодов времени (например, до двух часов) с достижением аналогичных результатов. Смесь люголь/клетки переносили в стерильную 500-мл бутылку с крышкой и центрифугировали со скоростью 7500 оборотов/мин в течение 15 минут. Жидкость супернатанта декантировали и выбрасывали.

35 При комнатной температуре добавляли стерильную дистиллированную воду до первоначального объема, осадок соскребали стерильным шпателем и клетки вторично суспендировали при помощи стерилизованного в автоклаве гомогенизатора T25, Ultra-Turrax, IKA, установленного в положение 2, в течение примерно 10 секунд. Клетки суспендировали и центрифугировали, как было описано выше, и трижды промывали для

40 отделения от раствора люголя. Во время последней промывки клетки ARC вновь суспендировали до 1/10 первоначального объема и замораживали при  $-80^{\circ}\text{C}$  в стерильных пробирках с завинчивающимися крышками с целью длительного хранения. Образцы объемом 0,1-1,0 мл культивировали на L-бульоне и LB-тетрациклине для проверки на отсутствие живых клеток.

Пример 6. Количественное определение биологической активности интерферона

Для выполнения биоанализов *in vitro* клетки бычьей почки (MDBK) выращивали до слияния и инкубировали с контрольными образцами *Pseudomonas* и образцами BGI/ARC с

разной степенью разведения в течение 24 часов. Затем все планшеты заражали вирусом

45 везикулярного стоматита (VSV) и инкубировали еще в течение 24 часов (10 и 29-32).

Содержимое микротитрационных планшетов сливали с клетками бычьей почки (MDBK). Жидкость супернатанта удаляли и в каждую лунку добавляли 100 мкг MEM с 5% FBS. Образцы, по 100 мкл каждый, добавляли в верхний ряд двух колонок. Для

50 интерферонположительного образца использовали исходную концентрацию, равную 100

ед/мл. Удельная активность стандартного BGI была равна  $3 \times 10^6$  ед/мг. Серийные разведения в отношении 1:2 начинали с первого ряда и продолжали до основания планшета. Микротитрационные планшеты инкубировали при 37°C в течение ночи с тем, чтобы интерферон в образцах клеток MDBK индуцировал антивирусное состояние. На следующий день вирус VSV разводили в MEM, получая при этом примерно 50

5  
бляшкообразующих единиц (PFU) на 100 мкл. Из планшетов удаляли всю жидкость и в каждую лунку добавляли разведенный вирус в количестве 100 мкл. Планшеты инкубировали при 37°C в течение одного часа для инфицирования клеток MDBK вирусом VSV. Затем с планшетов удаляли вирусный инокулят. При помощи 10-мл пипетки в каждую

10  
лунку добавляли одну каплю метилцеллюлозы. Планшеты снова инкубировали в течение ночи при 37°C, после чего метилцеллюлозу удаляли и планшеты окрашивали кристаллическим фиолетовым в течение примерно пяти минут.

Результаты первоначальных экспериментов свидетельствовали о великолепном антивирусном эффекте в клетках BGI/ARC. Фиксированные интактные клетки, содержащие

15  
BGI/ARC, дали лучшие результаты при титрах в пределах от  $10^7$  до  $10^{8.5}$ . При высоком уровне разведения, необходимом для защиты 50% клеток почки от гибели вследствие инфицирования VSV, для достижения требуемой активности нужно было только несколько десятков пикограммов BGI/ARC. В отличие от этого, бычий IFN- $\alpha$  (BAI) в рекомбинантных измененных клетках был значительно менее активен (таблица 2).

20

Как показано в таблице 3, последующие аналогичные эксперименты *in vitro* подтвердили эффективность BGI/ARC для защиты клеток бычьей почки от вируса VSV.

Низкая активность BAI, коэкспрессированного вместе с BGI в клетках ARC (примечание: несмотря на низкую активность BAI действуют синергично с BGI, стимулируя активность

25  
BGI в 10 раз, сравни таблицу 2), по-видимому, является следствием наблюдаемой агрегации большого количества белка BAI в клетках *Pseudomonas* в виде нерастворимого внутриклеточного тельца. Недавно полученные результаты экспериментов с использованием чаперонинов groEL/groES и слитых белков для сольюбилизации внутриклеточных телец в *E. coli* или других экспрессирующих системах позволяют

30  
предположить, что вышеуказанные или другие чаперонины могут быть полезны для сохранения BAI внутри клетки в растворимой активной форме. Однако эффективность штамма чаперонина dnaK, MB324, использованного в настоящем исследовании, по-видимому, является весьма незначительной для BAI в данном отношении.

#### Пример 7. Устойчивость BGI/ARC

Образцы клеток BGI/ARC (в стерильной воде), которые были получены после хранения при -80°C, выдерживали в течение шести месяцев при -20°C, 4°C, комнатной температуре и 37°C для испытания устойчивости при хранении; образцы не подвергали никаким

35  
манипуляциям и к образцам не добавляли никакие дополнительные вещества. Образцы возвращали на хранение при -80°C после разных периодов инкубации и хранили до истечения шестимесячного периода испытания. При выполнении биоанализов с использованием клеток бычьей почки, инфицированных вирусом VSV, образцы BGI/ARC не утрачивали активность в течение шести месяцев хранения при -20°C или 4°C. Кроме того, образцы BGI/ARC оставались устойчивыми в течение восьми-семнадцати дней нахождения при комнатной температуре, причем клетки BGI/ARC могут оставаться устойчивыми до

40  
четырех дней при 37°C (см. фиг.5).

Количество и активность BGI в фиксированных клетках *Pseudomonas* были исключительно высокими. Как показано в приведенных выше примерах: 1) клетки *Pseudomonas* являются хорошей биофабрикой для производства IFN- $\gamma$ , способной продуцировать до 40% или больше интерферона от общего клеточного белка; 2)

50  
процедуры стабилизации и изменения ARC существенно не разрушают IFN- $\gamma$  и не создают барьер для экспрессированного IFN- $\gamma$ ; 3) клетки BGI/ARC являются активными в пикограммовом диапазоне; 5) клетки BGI/ARC характеризуются великолепным потоком микрочастиц, позволяют использовать шприц и обладают хорошими свойствами

суспендирования; б) препарат фиксированных клеток ARC защищает BGI и другие экспрессированные белковые продукты от денатурации в результате повторных манипуляций, замораживания или других потенциально разрушающих действий.

У млекопитающих продуцирование  $\gamma$ -интерферона в активированных Т-клетках и естественных клетках-киллерах может быть стимулировано аллоантигенами, опухолями или митогенами. Установлено, что помимо антивирусной активности  $\gamma$ -интерферон может ингибировать опухоли [10-12] и стимулировать конечную дифференцировку В-клеток с образованием иммуноглобулин-продуцирующих клеток [15; 16]. Гамма-интерферон может также активировать макрофаги, усиливать цитотоксичность естественных клеток-киллеров, стимулировать цитотоксичность Т-клеток и оказывать синергичное действие вместе с  $\alpha$ -интерфероном [7] благодаря наличию специфических рецепторов на поверхности клеток [17]. Таким образом, повышенная активность  $\gamma$ -IFN в клетках BGI/ARC позволяет получить очень полезный терапевтический или профилактический продукт и, кроме того, может быть весьма ценной при коэкспрессии IFN- $\gamma$  с другими цитокинами.

Как видно из нижеследующих примеров, клетки BGI/ARC действуют даже лучше *in vivo*, чем *in vitro*. Хотя исследования, выполненные в других лабораториях [13; 18; 26] показали, что IFN- $\gamma$  и другие специфические гамма-интерфероны являются исключительно эффективными адъювантами, более высокая активность клеток IFN- $\gamma$ /ARC и их преимущества, выражающиеся в устойчивости, низкой стоимости, простоте производства, меньших затратах времени, отсутствии флокуляции и высоком потоке микрочастиц, делают клетки IFN- $\gamma$ /ARC чрезвычайно привлекательной альтернативой адъюванту. Кроме того, результаты экспериментов с использованием клеток IFN- $\gamma$ /ARC показывают, что они обладают удивительной способностью действовать в качестве иммуноакселератора, а также в качестве мощного иммуоадъюванта, так как IFN- $\gamma$ , экстрагированный из *P. fluorescens*, был исключительно активным, причем весьма удивительно, что он сохранял активность при выполнении анализа культуры ткани почки. Как показано в нижеследующих примерах, IFN- $\gamma$ , инкапсулированный в клетки ARC, является более активным *in vivo*, чем в растворимой форме, и обладает дополнительным свойством, действуя в качестве иммуноакселератора вакцины.

#### Пример 8. Анализы индукции главного комплекса гистосовместимости (МНС) класса II

Другим методом оценки активности BGI было измерение воздействия BGI на способность клеток почки или дендритных клеток индуцировать продуцирование антигенов МНС класса II. MDBK или дендритные клетки вторично суспендировали в количестве  $5 \times 10^6$  клеток/мл в среде MEM, содержащей 10% физиологического раствора с фосфатным буфером. Аликвоты, равные 4 мл, помещали на шестилуночные планшеты и инкубировали в течение ночи при 37°C. Все среды удалили с планшетов и каждую лунку промывали HBSS. В половину лунок вводили 5 мл среды MEM, содержащей 100 нг/мл BGI. В другую половину лунок вводили среду MEM с BGI. Планшеты инкубировали в течение ночи при 37°C. Среда снова удаляли и лунки промывали HBSS. В каждую лунку добавляли 1 мл нижеследующей смеси: 17,5 мл лидокаина, 32,2 мл HBSS, pH доводили до 7,4, добавляя 1 н. раствор NaOH. Клетки удаляли из лунок скребком для клеток, промывали от лидокаина, окрашивали FACS и анализировали в устройстве Becton Dickenson Facscan. (2; 3; 5; 7; 14; 15; 18; 19; 26 и 27).

При выполнении нижеследующих анализов были использованы коммерчески доступные клетки бычьей почки (MDBK) или дендритные клетки, выделенные у крупного рогатого скота. Термин "МНС %" означает измеренное в процентах число клеток, экспрессирующих антиген МНС. Как показано в таблице 4, полученной на основании данных, приведенных на фиг.6А и 6В, выполняли сравнение BGI/ARC, контрольных образцов ARC и двух разных очищенных образцов BGI.

На фиг.6А графически изображена кривая экспрессии МНС чистым рекомбинантным бычьим IFN- $\gamma$  (RecBoIFN $\gamma$ ), выделенным из *E. coli*. На фиг.6В показано сравнение 1) контрольной нетрансформированной клетки-хозяина *P. fluorescens* (MB324), 2)

контрольной клетки ARC (MR1241), трансформированной только вектором рMYC1803, 3) клетки BGI/ARC (трансформированной геном BGI) (MR1605), и 4) очищенного BGI, выделенного из *P. fluorescens* (DOWIFN). Наблюдается практически одинаковая экспрессия MB324 и MR1241.

5 Дендритные клетки, выделенные из крови, также анализировали в отношении экспрессии МНС. На фиг.7А показано воздействие очищенного RecBoIFN $\gamma$ , выделенного из *E. coli*. На фиг.7В показано сравнение 1) контрольной нетрансформированной клетки-хозяина *P. fluorescens* (MB324), 2) контрольной клетки ARC (MR1241), трансформированной только вектором рMYC1803, 3) клетки BGI/ARC  
10 (трансформированной геном BGI) (MR1605), и 4) очищенного BGI, выделенного из *P. fluorescens* (DOWIFN).

Пример 9. Дозиметрическое титрование активности BGI у крупного рогатого скота [2; 3; 5; 7; 14; 15; 18; 19; 26 и 27]

15 Испытанию подвергали четыре группы крупного рогатого скота с целью определения минимальной дозы бычьего IFN- $\gamma$ /ARC (BGI/ARC), которая должна обладать детектируемой биологической активностью. Телятам, распределенным в четыре группы по пять телят в каждой, А, В, С и D, подкожно инъецировали дозы BGI/ARC, соответственно равные 4800, 480, 48 и 0 мкг. Контрольная доза ARC, равная 0 мкг, была идентична экспериментальным образцам за исключением того, что в контрольных клетках *Pseudomonas* отсутствовал ген  
20 бычьего IFN- $\gamma$ .

Данный эксперимент выполняли в соответствии с нижеследующим протоколом:

1. Три мл BGI/ARC и три мл контрольных клеток ARC разводили физиологическим раствором с фосфатным буфером (PBS) до конечного объема, равного шести мл, который является достаточным для получения пяти эквивалентных 1-мл доз для каждого из пяти  
25 телят в группах, которым вводили соответственно BGI в высокой концентрации и контрольные клетки ARC. Кроме того, производили два серийных 10-кратных разведения исходного препарата BGI/ARC, для чего в PBS разводили 0,4 мл исходного раствора BGI/ARC или исходный раствор, разведенный в отношении 1/10, доводили до конечного объема, равного 4,0 мл. Три мл каждого серийно разведенного препарата BGI/ARC (1/10 и  
30 1/100) затем разводили до конечного объема, равного шести мл, который является достаточным для получения пяти 1-мл доз для каждой из двух групп телят, представляя образцы BGI/ARC, разведенные соответственно в отношении 1/10 и 1/100.

2. Образцы BGI/ARC и контрольных клеток ARC выливали в стерильные закупоренные стеклянные пробирки и маркировали с обозначением номера соответствующей группы (таблица 5), даты и инструкций по введению.  
35

3. Образцы хранили при 4°C до введения, производимого ветеринарами.

Ветеринару в клинике был предоставлен список с номерами животных и обозначениями их групп. Телят произвольно распределяли в экспериментальные группы путем создания списка случайных чисел (программа Excel). Случайные числа располагали по порядку и  
40 последовательно присваивали группам А, В, С и D.

Для обнаружения биологической активности использовали такие критерии как изменение температуры тела и массы тела. Одна подкожная инъекция примерно 4800 мкг BGI/ARC вызывает значительное повышение температуры тела в течение 48 часов после инъекции (фиг.8) и продолжительное (>4 дней) снижение массы тела (фиг.9). Одна подкожная  
45 инъекция примерно 480 мкг BGI/ARC вызывает небольшое повышение температуры тела (<1°C) в течение 48 часов после инъекции и продолжительное (>4 дней) снижение массы тела. Одна подкожная инъекция примерно 48 мкг BGI/ARC не вызывает детектируемого изменения температуры тела, но является причиной небольшого (<5 кг) снижения массы тела в течение 24 часа после инъекции. Одна подкожная инъекция  
50 примерно 0,5 мл образца контрольных клеток ARC не вызывает детектируемого изменения температуры тела или массы тела.

Один теленок из группы А, которому была инъецирована доза, равная 4800 мкг BGI/ARC, умер в 1-й день после инъекции. Результаты аутопсии выявили поражения,

соответствующие диагнозу вздутия живота (rumen stasis). Никаких других общих или гистологических поражений обнаружено не было. Другие телята в данной группе выжили, но у них наблюдались типичные симптомы, характерные для передозировки интерферона, включающие значительную потерю массы тела и повышение температуры тела. Животных

5 обследовали ежедневно с целью выявления различных клинических признаков, включающих хромоту, вялость, анорексию, диарею и припухлость в месте инъекции. У большинства животных в группе А (4800 мкг BGI) был обнаружен один или несколько вышеуказанных клинических признаков на 2-й, 3-й и 4-й день после инъекции. У животных

10 в группе В (480 мкг BGI) часто наблюдались вышеуказанные клинические признаки, но только в первый день после инъекции (фиг.10). Исследования методом дозиметрического титрования показывают, что дозы BGI в клетках BGI/ARC, отобранных для исследования адъювантов, должны находиться в пределах 50 мкг или меньше. У животных, которым

15 вводили указанную дозу BGI, отсутствовали клинически детектируемые вредные реакции. Сильные, характерные для интерферона реакции, вызываемые клетками BGI/ARC у телят, сопоставимы с BGI, выделенным из ARC, который характеризуется удельной активностью, примерно в 1000 раз превышающей активность очищенного растворимого бычьего IFN- $\gamma$ .

Уровни сывороточного гаптоглобина определяли у каждого животного в 0-й, 2-й и 4-й день после инъекции (таблица 6). У телят в группе С содержание гаптоглобина в среднем было равно 243,011 нг/мл при дозе 48 мкг BGI/ARC. Сравнение данного результата со

20 средним содержанием гаптоглобина, равным 38,807 нг/мл, у контрольных животных показывает, что даже такая низкая доза как 48 мкг может индуцировать сильное увеличение продуцирования гаптоглобина.

Уровни сывороточной 2'5'A-синтетазы также определяли у каждого животного в 0-й, 2-й и 4-й день после инъекции; результаты данного измерения приведены в таблице 7.

#### 25 Пример 10. Влияние BGI/ARC на вторичную иммунную реакцию

Телят иммунизировали 50 мкг альбумина свиной сыворотки (PSA) вместе с введением

следующих веществ: группа А, 250 мкг BGI/ARC; группа В, 25,0 мкг BGI/ARC; группа С, 2,5 мкг BGI/ARC; группа D, контрольные клетки ARC (ARC без вставки BGI) с

30 использованием достаточного количества клеток ARC для получения контрольного эквивалента целлюлозной массе, вводимой группе А. Первичную иммунизацию телят производили в 0-й день (стрелка), и повторную иммунизацию производили на 28-й день (стрелка). Каждая группа состояла из шести телят породы Angus-Hereford в возрасте 6-8 месяцев, которые были или телочками, или кастрированными бычками. Полученные

35 данные выражены в виде среднего значения  $\pm$  стандартная ошибка средней (SEM) и показаны на фиг.11.

Данные, полученные для вторичной иммунной реакции, сопоставимы с данными, полученными для первичной иммунизации. Наименьшая доза BGI/ARC (2,5 мкг BGI) вызвала наибольшее увеличение титра антител, в то время как контрольные клетки ARC без вставки BGI лишь незначительно усиливали иммунную реакцию, если такое усиление

40 вообще имело место. Разница между контрольным образцом и максимальным титром увеличилась с 27 раз в случае первичной реакции до более, чем в 150 раз в случае вторичной реакции. Как показано на фиг.12, клетки BGI/ARC оказывают пролиферативное действие на лимфоциты (при измерении путем введения  $^3\text{H}$  тимидина).

Приведенные примеры показывают, что клетки ARC являются ценным средством

45 дешевого продуцирования, получения и доставки стабилизированного IFN- $\gamma$ . Клетки IFN- $\gamma$ /ARC также можно использовать в качестве иммуноадъювантов и акселераторов иммунной реакции. Как описано в данной заявке: 1) экспрессирующую систему *Pseudomonas fluorescens* можно использовать для недорогого продуцирования IFN- $\gamma$  в

50 больших количествах, соответствующих уровням экспрессии коммерческого инсектицида MBP® [9], представляющего собой белок (при помощи способа, описанного в данной заявке, можно продуцировать более одной тонны IFN- $\gamma$  в результате одной 100000-литровой ферментации); 2) химическая стерилизация изменяет клетки *Pseudomonas*, стабилизирует содержание IFN- $\gamma$  в клетках ARC и обеспечивает эффективное

высвобождение IFN- $\gamma$  изнутри или с поверхности макрофага или другой клетки, взаимодействующей с IFN- $\gamma$ ; 3) измененные и стабилизированные клетки BGI/ARC являются активными в интактной форме, и пикограммовые уровни IFN- $\gamma$  защищают клетки от инфицирования вирусом (см., например, инфицирование вирусом VSV клеток бычьей почки); 4) в отличие от многих других рекомбинантных белков IFN- $\gamma$  является растворимым, может быть сверхэкспрессирован в клетках *P. fluorescens* в растворимой форме и не образует включений в клетках даже при экспрессии на уровнях, превышающих 40% от общего клеточного белка; 5) клетки BGI/ARC обладают великолепными свойствами хранения и остаются устойчивыми и активными, находясь при 37°C в течение нескольких недель, и сохраняют активность на протяжении более 6 месяцев в замороженном виде; 6) клетки BGI/ARC обладают великолепными физическими свойствами; они представляют собой механически прочные, не образующие хлопьев микроскопические частицы, которые сохраняются в суспензии и легко проходят через шприц; 7) клетки BGI/ARC обладают требуемыми свойствами высвобождения в зависимости от времени; 8) микрограммовые количества IFN- $\gamma$  в клетках BGI/ARC вызывают неожиданно сильную реакцию у крупного рогатого скота и стимулируют неожиданно сильные реакции в качестве иммуoadъюванта и иммуноакселератора и 9) клетки BGI/ARC можно вводить внутримышечно, подкожно или через слизистые оболочки, что делает возможной атравматичную доставку лекарственного средства. Применимость настоящего изобретения далее иллюстрируют приведенные ниже примеры с использованием птичьего IFN- $\gamma$ /ARC (CGI/ARC).

#### Пример 11. Влияние IFN- $\gamma$ на птичий макрофаг

Приобретенные линии клеток птичьего (куриного) макрофага (MQ-NCSU и HD11) амплифицировали и создавали запас клеток для испытания *in vitro*. Обе линии клеток выращивали на 24-луночных планшетах и стимулировали рекомбинантным куриным IFN- $\gamma$  (CGI) в разных концентрациях. Были выполнены два отдельных эксперимента. В первом эксперименте клетки обрабатывали CGI через один день после начала культивирования. Во втором эксперименте клетки обрабатывали CGI через пять дней после начала культивирования.

Клетки анализировали на продуцирование оксида азота (NO) в 1-й, 2-й, 3-й, 5-й, 6-й, 9-й, 13-й и 16-й день (после обработки CGI) в первом эксперименте (то есть когда макрофаг обрабатывали CGI через один день после начала культивирования). Клетки, обработанные CGI через пять дней после начала культивирования, анализировали на продуцирование NO в 1-й, 2-й, 3-й, 6-й, 9-й и 15-й день после обработки CGI. Образцы супернатанта культуры удаляли из отдельных лунок и центрифугировали со скоростью 4000 оборотов/мин в течение по крайней мере пяти минут для очистки супернатанта. Концентрации NO определяли в двух одинаковых образцах с использованием реагента Грейса. Образцы клеток, не стимулированных CGI, также анализировали в качестве контрольных образцов при выполнении каждого анализа NO. CGI активирует продуцирование NO, поэтому продуцирование NO использовано в данной заявке для демонстрации активности CGI. В таблице 10 указана максимальная концентрация NO, день (после добавления CGI), когда наблюдались максимальные концентрации NO, и концентрации рекомбинантного CGI, обеспечивающие максимальное продуцирование NO указанными линиями клеток.

Вторую серию экспериментов выполняли, используя клетки на 2-й день после начала культивирования. Клетки стимулировали рекомбинантным очищенным CGI (RCGI), BGI/ARC, CGI/ARC (серия 1) и CGI/ARC (серия 2). Линии клеток анализировали на продуцирование NO через три или четыре дня после стимуляции 10 нг или 100 нг IFN- $\gamma$ . Полученные результаты приведены в таблицах 11 и 12 и на фиг.13. Весьма удивительным было то, что, хотя и в меньшей степени, чем CGI, бычий гамма-интерферон (BGI) стимулировал птичий макрофаг.

#### Пример 12. Введение птицам клеток ARC, содержащих куриный IFN- $\gamma$

Клетки CGI/ARC были получены вышеописанным способом, и растительный антиген HN

был получен методами, известными в данной области (см., например, патент США № 5310678 и предварительную заявку на патент США 60/467998, поданную 5 мая 2003 г, которые полностью включены в данное описание изобретения в качестве ссылки), в которые были внесены нижеследующие модификации. Клетки NT1, содержащие

5 растительный антиген, собирали через 6-12 дней после пассирования культуры. Цельные мокрые клетки NT1, собранные непосредственно из культуры клеток, фильтровали для удаления избытка среды при помощи фильтра Spectramesh 30, установленного в воронку Бюхнера, выливая клетки и среду на фильтр в условиях небольшого вакуума.

Для получения вакцины HN, используемой для выполнения анализа, 0,5 г клеток  
10 вводили в 2 мл экстракционного буфера (физиологический раствор с фосфатным буфером Дульбекко (DPBS), 1 mM EDTA, pH 7,2)) и обрабатывали ультразвуком на льду в течение примерно 2 минут. Обработку ультразвуком производили при помощи ультразвукового дезинтегратора Branson 450 с использованием сменного микронаконечника при выходной мощности 8, рабочий цикл 60, в течение 2 минут (для получения больших объемов (>5  
15 г) обработку ультразвуком производили на льду в течение 5-10 минут). Гомогенат, полученный из клеток под воздействием ультразвука, помещали на лед до использования. Инактивированный штамм NDV La Sota был получен из аллантииновой жидкости (Lohman Animal Health) при титре предварительно инактивированного яйца <sup>10,6</sup> EID<sub>50</sub>/мл. Аллантииновую жидкость хранили до использования в виде замороженного препарата (-  
20 80°C).

Для вакцинации были приобретены суточные цыплята SPF в компании SPAFAS (North Franklin, Conn.), которых поместили в клетки для акклиматизации, где они находились в течение 7 суток. Количество цыплят, используемых для вакцинации, было определено  
25 совершенно произвольно при двукратном подсчете. Лишние цыплята были произвольно помещены в отдельные клетки и использованы для замены цыплят, умерших в результате стресса при транспортировке или размещении. Подкожную вакцинацию выполняли в виде инъекции 0,1-0,25 мл в затылочную часть шеи.

Определение вводимой дозы антигена и CGI/ARC выполняли следующим образом. Образцы из растительных клеток получали, гидратируя высушенные вымораживанием  
30 экстракты CHN в DPBS с 25 мкг CGI/ARC. Инактивированную аллантииновую жидкость оттаивали и перемешивали, добавляя 25 мкг CGI/ARC непосредственно в образец. Для получения образцов из растительных клеток, содержащих эмульсию масла в воде, высушенный вымораживанием материал суспендировали непосредственно в DPBS, содержащем 0,5% твина и 2,5% дракеолового масла с 0,165% Span 80. Выполняли две  
35 вакцинации антигеном (в 0-й день и 7-й день жизни), повторную вакцинацию производили через 14 дней (21-й день жизни) и через 35 дней (42-й день жизни) цыплятам вводили инактивированную NDV-инфицированную аллантииновую жидкость (описанную выше) и завершали эксперимент через 42 дня (49-й день жизни). У каждого цыпленка брали 1-2 мл пробу крови при помощи венопункции яремной вены или периферической вены крыла в 14-  
40 й, 21-й, 35-й и 42-й день исследования.

Для измерения иммунной реакции в компании Colorado Serum были приобретены эритроциты цыплят в растворе Альсевера (CRBC) (№ партии 8151). Чтобы получить 1% раствор CRBC, пять мл раствора переносили в 15 мл коническую пробирку и  
45 центрифугировали с ускорением 250×g в течение 10 минут. Супернатант и светлый слой кровяного сгустка отсасывали пипеткой с осадка эритроцитов; осадок дважды промывали, повторно суспендируя в 1-кратном объеме DPBS (физиологический раствор с фосфатным буфером Дульбекко) (№ партии 003435E JRH), и центрифугировали с ускорением 250×g в течение 10 минут. Осадок вторично суспендировали до 1% (об./об.) в DPBS. Для  
50 подтверждения правильности концентрации суспензии 400 мкл переносили в 1,6 мл деионизированной воды и лизировали клетки путем интенсивного перемешивания. Значение оптической плотности (OD<sub>540</sub>) находилось в пределах 0,4-0,5. 1% растворы хранили до использования при 2-7°C.

Для определения гемагглютинации 96-луночный планшет с U-образными лунками

(Falcon) сначала опрыскивали Static Guard® и промокали бумажными салфетками. Образцы вируса предварительно разводили в DPBS в отношении 1:2 и в каждую лунку 96-луночного планшета вводили 50 мкл DPBS. Разведенный вирус добавляли в лунки первого ряда и затем серийно разводили в 2 раза до требуемого числа разведений для каждого образца вируса. В каждую лунку добавляли 50 мкл 1% CRBC и содержимое планшета перемешивали со скоростью 600 оборотов/мин в течение 20 секунд. Планшет помещали на мокрые бумажные салфетки и инкубировали до тех пор, пока CRBC в контрольных лунках (DPBS и CRBC в отношении 1:1) не образовывал осадок в основании лунки, или в течение по крайней мере 1 часа при 2-7°C. Конечной точкой было серийное разведение содержимого последней лунки, обеспечивающее 100% агглютинацию.

Вирус предварительно разводили в DPBS, получая 4-8 единиц НА на 50 мкл (в расчете на вышеуказанное титрование вируса). На отдельном планшете в каждую лунку колонок 1 и 3-12 вводили 25 мкл DPBS; в каждую лунку колонок 1 и 3 добавляли 25 мкл сыворотки; сыворотку в колонке 3 серийно разводили в 2 раза на протяжении 10 лунок.

Предварительно титрованный вирус (25 мкл) добавляли во все лунки колонок 3-12 и смешивали со скоростью 600 оборотов/мин в течение 20 секунд; планшет инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа +/- 15 минут. Затем в каждую лунку добавляли 50 мкл 1% CRBC, смешивали в течение 20 секунд со скоростью 600 оборотов/мин и инкубировали в увлажняющей камере в течение ночи при 2-7°C для вируса AIV и в течение 1-2 часов при 2-7°C для вируса NDV. Титр сыворотки в последней лунке серийного разведения ингибирует агглютинацию на 100%.

Геометрическую среднюю титра (GMT) сыворотки определяли для каждой экспериментальной группы при помощи программного обеспечения Microsoft Excel 2000, версия 9.0.3821 SR-1. При выполнении указанных измерений фоновым титрам ELISA <10 было присвоено значение, равное 1. Разницу между средними значениями, полученными методом наименьших квадратов у испытуемых и контрольных цыплят, определяли путем анализа методом наименьших квадратов. Вакцинация считалась эффективной при выявлении существенной разницы между экспериментальной группой и невакцинированной контрольной группой.

Титр HI, полученный при каждом отборе пробы крови, показан в таблице 13. На 21-й день (через 7 дней после введения второй дозы) наблюдалось 4-кратное повышение титра HI при использовании 20 мкг дозы растительного белка HN для введения IFN-γ и 2-кратное повышение при смешивании с эмульсией масла в воде. Полученные результаты показывают, что антиген, вводимый вместе с IFN-γ (CGI/ARC), может вызывать повышенную реакцию сыворотки на антиген-мишень по сравнению с антигеном, вводимым без CGI/ARC (см. таблицу 13).

#### Список ссылок

1. Ada, G. and G. Karupiah. 1997. Overview of Host Defense Mechanisms with Special Reference to Viral Infections, p. 1-18. In G. Karupiah (ed.), Gamma Interferon in Antiviral Defense. Chapman & Hall, New York.

2. Anderson, K.P., E.H. Fennie, and T. Yilma. 1988. Enhancement of a secondary antibody response to vesicular stomatitis virus "G" protein by IFN-gamma treatment at primary immunization. J.Immunol. 140:3599-3604.

3. Babiuk, L.A., L.M. Sordillo, M. Campos, H.P.A. Hughes, A. Rossi-Campos, and R. Harland. 1991. Application of interferons in the control of infectious diseases of cattle. Journal of Dairy Science 74:4385-4398.

4. Barnes, Andrew C. and Cummings, Susan G. Cellular encapsulation of biological pesticides. 86300128[US 693080 1985-01-22]. 7-15-1992. 1-9-1986.

Ref Type: Patent

5. Cerretti, D.P., K. McKereghan, A. Larsen, D. Cosman, S. Gillis, and P. E. Baker. 1986. Cloning, Sequence, and Expression of Bovine Interferon-Gamma. J.Immunol. 136: 4561-4564.

6. Fox, L.K., H.D. Liggitt, T. Yilma, and L.B. Corbeil. 1990. The effect of

interferon-gamma intramammary administration on mammary phagocyte function. Zentralbl. Veterinarmed. 37:28-30.

7. Fransen, L., M.R. Ruyschaert, J. van der Heyden, and W. Fiers. 1986.

Recombinant tumor necrosis factor: Species specificity for a variety of human and murine transformed cell lines. Cell Immunol. 100:260-267.

8. Friedman, R.M. and S.N. Vogel. 1983. Interferons with special emphasis on the immune system. Adv. Immunol. 34:97-140.

9. Gaertner, F.H., T.C. Quick, and M.A. Thompson. 1993. CellCap: An Encapsulation System for Insecticidal Biotoxin Proteins, p. 73-83. In L. Kim (ed.), Advanced

Engineered Pesticides. Marcel Dekker, Inc., New York.

10. Gough, R.E., W.H. Allan, D.J. Knight, and J.W.G. Leiper. 1975. Further studies on the adjuvant effect of an interferon inducer brl-5907 on newcastle disease and avian influenza inactivated vaccines. J.Immunol. 19:185-188.

11. Gresser, I., C. Maury, and F. Belardelli. 1987. Anti-tumor effects of interferon in mice injected with interferon-sensitive and interferon-resistant friend leukemia cells vi. Adjuvant therapy after surgery in the inhibition of liver and spleen metastases. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 39:789-792.

12. Knight, E.J. 1976. Antiviral and cell growth inhibitory activities reside in the same glycoprotein of human fibroblast interferon. Nature 262:302-303.

13. Lofthouse, S.A., A.E. Andrews, M.H. Elhay, V.M. Bowles, E.N.T. Meeusen, and A.D. Nash. 1996. Cytokines as adjuvants for ruminant vaccines. International Journal for Parasitology 26:835-842.

14. Michalski, W.P., B.J. Shiell, T.E. O'Neil, G. Beddome, and J.W. Lowenthal. 1999. Recombinant chicken IFN-gamma expressed in Escherichia coli: analysis of C-terminal truncation and effect on biologic activity. J.Interferon Cytokine Res. 19:383-392.

15. Opdenakker, G., Y. Cabeza-Arvelaiz, and J. Van Damme. 1989. Interaction of interferon with other cytokines. Experientia 45:513-520.

16. Perussia, B., E.T. Dayton, R. Lazarus, V. Fanning, and G. Trinchieri. 1983. Immune interferon induces the receptor for monomeric IgG1 on human monocytic and myeloid cells. Cell Immunol. 154:287-295.

17. Pestka, S., J.A. Langer, K.C. Zoon, and C.E. Samuel. 1987. Interferons and their actions. Annu. Rev. Biochem. 56:727-777.

18. Pighetti, G.M. and L.M. Sordillo. 1996. Specific immune responses of dairy cattle after primary inoculation with recombinant bovine interferon-gamma as an adjuvant when vaccinating against mastitis. American Journal of Veterinary Research 57:819-824.

19. Rammler, David H., Gaertner, Frank H., and Edwards, David L. Pseudomas hosts transformed with bacillus endotoxin genes. Mycogen Corporation. 980129[05281532]. 1-25-1994. 11-23-1992.

Ref Type: Patent

20. Sordillo, L.M. and L.A. Babiuk. 1990. Controlling acute experimental Escherichia coli mastitis with recombinant bovine interferon-gamma. Journal of Dairy Science 73:212.

21. Steinbeck, M.J., J.A. Roth, and M.L. Kaeberle. 1986. Activation of bovine neutrophils by recombinant interferon-gamma. Cell Immunol. 98:137-144.

22. Vilcek, J. and E. Demaeyer. 1985. Interferon Vol. 2: Interferon and the Immune System. Elsevier, Amsterdam.

23. Yilma, T., K. Anderson, K. Brechling, and B. Moss. 1987. Expression of an adjuvant gene interferon-gamma in infectious vaccinia virus recombinants, p. 393-396. In R.M. Chanock, H. Glensburg, and R. Lerner (eds.), Vaccines 87. Modern approaches to new vaccines including prevention of AIDS. Cold Spring Harbor, New York.

24. Yilma, T., S. Owens, E.H. Fennie, and K.P. Anderson. 1989. Enhancement of primary and Secondary Immune Responses by Interferon-gamma. Adv. Exp. Med. Biol. 251:

145-152.

25. Yip, Y.K., H.C. Kelker, K.T. Pearlstein, and J. Vilcek. 1984. Purification and structural-functional characterization of human immune interferon. 3:283.

5 26. Zuffa, A. and N. Feketeova. 1980. Protection of cattle vaccinated with inactivated oil adjuvant infectious bovine rhino tracheitis vaccine against experimental infection. 27:725-733.

Таблица 1 Факторы, определяющие иммунную реакцию		
Семейство	Члены семейства	Другие названия
10 Интерфероны (IFN)	IFN- $\alpha$	Лейкоцитарный интерферон
	IFN- $\beta$	Фибробластомный интерферон
	IFN- $\gamma$	Иммунный интерферон
Факторы некроза опухоли (TNF)	TNF	TNF- $\alpha$ , кахектин
	Лимфотоксин	TNF- $\beta$
15 Интерлейкины (IL)	IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$	Эндогенный пироген, фактор активации лимфоцитов, эндогенный медиатор лейкоцитов, гемопоэтин 1
	IL-2	Фактор роста Т-клеток
	IL-3	Сильный CSF, фактор роста мастоцитов
	IL-4	фактор стимуляции В-клеток 1 (BSF-1)
	IL-5	Фактор, замещающий Т-клетки (TRF), фактор дифференцировки эозинофилов, фактор роста В-клеток II (BCGF-II)
20 Колониестимулирующие факторы (CSF)	IL-6	Фактор стимуляции В-клеток 2 (BSF-2), интерферон- $\beta_2$ , фактор стимуляции гепатоцитов (HSF)
	CSF гранулоцитарного макрофага (GM-CSF)	CSF-2
	CSF гранулоцитов (G-CSF)	Плюрипоэтин
25 Другие факторы роста и регуляторные факторы (GF)	CSF макрофага (M-CSF)	CSF-1
	Эритропоэтин	
	Эпидермальный фактор роста (EGF)	
	Фактор роста фибробластов (кислый и основной FGF)	
30	Инсулиноподобный фактор роста 1 (IGF-1)	Соматомедин С
	Инсулиноподобный фактор роста 2 (IGF-2)	Соматомедин А
	Фактор роста нервов (NFG)	
	Тромбоцитарный фактор роста (PDGF)	
35	Трансформирующий фактор роста- $\alpha$ (TGF- $\alpha$ )	
	Трансформирующий фактор роста- $\beta$ (TGF- $\beta$ )	

Таблица 2 Анализ инфицирования вирусом		
Образец	Интерферон	Титр антивирусных антител
40 Контрольные клетки ARC (нетрансформированные измененные клетки MB324)	Нет	<10 <sup>3</sup>
BAI/ARC (BAI-трансформированные измененные клетки MB324)	0,36 мг/мл	10 <sup>3</sup>
BGI/ARC (BGI-трансформированные измененные клетки MB324)	1,8 мг/мл	10 <sup>6,5</sup>
BGI/ARC + BAI/ARC (1,26 мг $\gamma$ + 0,54 мг $\alpha$ )	1,8 мг/мл	10 <sup>7,5</sup>
45 Контрольный экстракт (нетрансформированный экстракт MB324)	Нет	<10 <sup>3</sup>
Экстракт BGI (BGI-трансформированный экстракт MB324)	0,41 мг/мл	10 <sup>6</sup>

Таблица 3 Анализ инфицирования вирусом		
Образец	Интерферон	Титр антивирусных антител
50 Контрольные клетки ARC № 1 (нетрансформированные измененные клетки MB324)	Нет	<10 <sup>2</sup>
Контрольные клетки ARC № 2 (pMYC1803-трансформированные измененные клетки MB324)	Нет	<10 <sup>2</sup>
BGI/ARC (BGI-трансформированные измененные клетки MB324)	1,8 мг/мл	10 <sup>7</sup>
Очищенный BGI клеток P.fluorescens	1,6 мг/мл	10 <sup>7,3</sup>
Очищенный BGI E. Coli	2,0 мг/мл	10 <sup>7,5</sup>

**Таблица 4**  
Анализ индукции МНС класса II с использованием клеток бычьей почки

Общий белок ARC (нг)	MB324/ARC Трансформированные вектором контрольные клетки BGI (нг)/МНС %	BGI/ARC BGI-трансформированные клетки BGI (нг)/МНС %	
66000000	0/21	22000,00/100	
6600000	0/21	2200,00/100	
660000	0/21	220,00/100	
66000	0/20	22,00/99	
6600	0/20	2,20/90	
660	0/19	0,22/60	
Белок BGI (нг)	BGI/ARC BGI-трансформированные клетки МНС %	Чистый BGI, выделенный из P. fluorescens (стандарт DAS) МНС %	Чистый BGI, выделенный из E. coli (контрольный) МНС %
0	20	20	20
22	-	30	-
220	60	60	40
2200 (2,2 нг)	85	80	60
22000	93	90	80
220000	98	98	98
2200000 (2,2 нг)	99	99	-
22000000	100		

**Таблица 5**  
Обозначения групп и процедуры иммунизации

Группа А Содержание: 6 мл/пробирку Доза: подкожная инъекция 1 мл в правую сторону шеи	BGI/ARC (0,5 мл/животное)	Высчитанная доза BGI 4800 мкг/животное
Группа В Содержание: 6 мл/пробирку Доза: подкожная инъекция 1 мл в правую стороны шеи	BGI/ARC (0,05 мл/животное)	Высчитанная доза BGI 480 мкг/животное
Группа С Содержание: 6 мл/пробирку Доза: подкожная инъекция 1 мл в правую сторону шеи	BGI/ARC (0,005 мл/животное)	Высчитанная доза BGI 48 мкг/животное
Группа D Содержание: 6 мл/пробирку Доза: подкожная инъекция 1 мл в правую сторону шеи	контрольные клетки ARC (0,5 мл/животное)	Высчитанная доза BGI 0 мкг/животное

**Таблица 6**  
Сывороточный гаптоглобин (нг/мл)

Группа/доза	№ коровы	0-й день	2-й день	4-й день
A	345	3414,732	343278	339763
	349	14621,58	314864	313533
IFN-γ/ARC 4800 мкг	362	8043,093	329346	341830
	377	33402,99	330788	332746
B	331	2442,108	299233,1	314455
	332	431,2447	304025	318863
IFN-γ/ARC 480 мкг	347	4095,792	279063	302801
	351	3386,858	289166	148700
C	376	12092,41	318965	318863
	333	1145,308	293940	222203
IFN-γ/ARC 48 мкг	356	30964,4	301475	279036
	365	11002,64	328728	336975
D	375	30780,89	284906	194211
	378	9255,905	266531	182632
IFN-γ/ARC 0 мкг	328	4226,292	17537,6	27173,22
	329	949,357	22061,81	29538
Среднее значение	344	1125,977	10012,77	59289,64
	355	11862,54	18949,82	15312,98
Группа	371	10119,1	107177	62724
	А	14870,6	329569,0	331968,0
	В	4489,7	298090,4	280736,4

RU 2 335 535 C2

	C	16629,8	295116,0	243011,4
	D	5656,7	35147,8	38807,6
Стандартное отклонение	Группа	0-й день	2-й день	4-й день
	A	13182,9	11629,1	12890,2
	B	4467,6	15115,9	74102,4
	C	13523,5	22874,3	64395,4
	D	5078,3	40508,4	21004,7
Медианное значение	Группа	0-й день	2-й день	4-й день
	A	11332,3	330067,0	336254,5
	B	3386,9	299233,1	314455,0
	C	11002,6	293940,0	222203,0
	D	4226,3	18949,8	29538,0

**Таблица 7**  
**Уровни сывороточной 2'5'A-синтетазы (пмоль/дл)**

Группа/доза	№ коровы	0-й день	2-й день	4-й день
A	345	169,4	54,8	103,7
	349	81,1	26,6	300,1
IFN-γ/ARC 4800 мкг	362	1227,1	73,0	138,0
	377	439,4	407,5	646,7
B	331	137,7	59,8	185,7
	332	135,1	218,4	70,7
IFN-γ/ARC 480 мкг	347	164,5	89,3	86,0
	351	311,7	219,3	244,4
C	376	391,0	618,4	195,1
	333	142,5	71,5	143,4
IFN-γ/ARC 48 мкг	356	537,5	50,1	66,6
	365	105,7	355,3	144,8
D	375	81,8	48,4	59,7
	378	249,9	142,8	87,4
IFN-γ/ARC 0 мкг	328	358,2	143,8	119,3
	329	393,1	16,2	41,5
Среднее значение	344	132,8	203,6	47,3
	355	94,3	129,6	263,1
Группа	371	76,0	234,5	206,4
	Группа	0-й день	2-й день	4-й день
	A	479,2	140,5	297,1
	B	228,0	241,1	156,4
	C	223,5	133,6	100,4
	D	210,9	145,5	135,5
Стандартное отклонение	Группа	0-й день	2-й день	4-й день
	A	521,4	179,1	248,3
	B	116,6	223,2	74,8
	C	187,0	129,7	41,2
	D	152,3	84,1	97,7
Медианное значение	Группа	0-й день	2-й день	4-й день
	A	304,4	63,9	219,0
	B	164,5	218,4	185,7
	C	142,5	71,5	87,4
	D	132,8	143,8	119,3

**Таблица 8**  
**Хемокины**

Обозначение	Белок	Функция
BCA-1/BLC-1	Хемокин-1, привлекающий В-клетки (Хемоаттрактант В-лимфоцитов) (CXCL13)	Атрактант В-клеток
BRAC/Кес	Хемокины CXС в молочной железе и почке/хемокин, экспрессированный в почке (SCYB14, CXCL14)	Участвует в образовании МФ
CXCL16	Хемокин CXС 16	
ENA-78/LIX	Нейтрофилактивирующий белок 78, выделенный из эпителиальных клеток (CXCL5, SCYB5)	Нейтрофилактивирующий пептид

	Эотаксин-1	Эотаксин-1 (CCL11)	Хемотаксис эозинофилов
	Эотаксин-2/MPIF-2	Эотаксин-2 (CCL24,СКβ6)	Хемотаксический агент для Т-клеток и эозинофилов
	Эккодус-2/SLC	Эккодус-2 (CCL21, СКβ9, SCYA21)	Ангиостатическая активность, хемотаксический агент для Т-клеток, дендритных клеток, CD34 <sup>+</sup> гематопозитических клеток, NK-клеток и В-клеток
5	Фракталкин/нейротактин	Фракталкин/нейротактин (CX3CL1)	Хемотаксический агент для Т-клеток и моноцитов
	GROα/αM/GSA	Белок, стимулирующий рост меланомы (CXCL1)	Активация нейтрофилов
	HCC-1	Хемокин 1 гемофильтрата СС (SCYA14, CCL14)	Хемотаксический агент для моноцитов и клеток THP-1
	IL-8	Интерлейкин 8 (CXCL8)	Хемоаттрактант для нейтрофилов, базофилов и Т-клеток; активует нейтрофилы
10	I-TAC	Интерферонстимулированный альфа-хемоаттрактант Т-клеток (CXCL11)	
	Лимфотактин/АТАС/SCM	Лимфотактин (CL1, LTN)	Хемоаттрактант для Т-клеток и NK-клеток
	MCP-1/MCAF	Хемотаксический белок моноцитов 1 (CCL2, SCYA2)	Хемоаттрактант для моноцитов и нейтрофилов; усиливает противоопухолевую активность нейтрофилов
	MCP-3	Хемотаксический белок моноцитов 3 (CCL7, SCYA7)	Хемоаттрактант для моноцитов и эозинофилов; усиливает противоопухолевую активность моноцитов
15	MCP-4	Хемотаксический белок моноцитов 4 (CCL13, SCYA13)	Хемоаттрактант для моноцитов, лимфоцитов, базофилов и эозинофилов
	MDC/STCP-1/ ABCD-1	Хемокин, выделенный из макрофага (CCL22, SCYA22)	Хемоаттрактант для Т-клеток, активированных лимфоцитов и моноцитов
	MIP-1α	Воспалительный альфа-белок макрофага 1 (CCL3, SCYA3)	Хемоаттрактант для лимфоцитов
	MIP-1β	Воспалительный бета-белок макрофага 1 (CCL4, SCYA4)	Хемоаттрактант для моноцитов, дендритных клеток, NK-клеток и Т-клеток
20	MIP-2α/GROβ	Воспалительный альфа-белок макрофага 2 (CXCL2)	
	MIP-3α/эккодус/ LARC	Воспалительный альфа-белок макрофага 3 (CCL20, SCYA20)	Хемоаттрактант для лимфоцитов, активированных NK-клеток, дендритных клеток
	MIP-3β/эккодус-3/ELC	Воспалительный бета-белок макрофага 3 (CCL19, SCYA19)	Хемоаттрактант для Т-клеток, В-клеток и дендритных клеток
25	MIP-4/PARC/DC-CK1	Воспалительный белок макрофага 4 (CCL18, СКβ7, SCYB18)	Хемоаттрактант для Т-клеток
	RANTES	RANTES, ранее "Т-клеточноспецифический белок" (CCL5)	Хемоаттрактант для Т-клеток памяти, моноцитов и эозинофилов
	SDF1α	Альфа-фактор 1, выделенный из стромальных клеток	Хемоаттрактант для нейтрофилов, лимфоцитов и моноцитов
	TARC	Хемокин тимуса, регулируемый путем активации (CCL17)	Хемоаттрактант для активированных TH2-клеток
30	TECK	Хемокин, экспрессированный в тимусе (CCL25)	Хемоаттрактант для тимоцитов, МФ, клеток Thp-1 и дендритных клеток

			Таблица 9 Цитокины
	Обозначение	Белок	Функция
35	GM-CSF	Колонистимулирующий фактор макрофагов	Рост и дифференцировка линий гематопозитических клеток (например, гранулоцитов, МФ, эозинофилов и эритроцитов)
	IFN-α	Альфа-интерферон	Противоопухолевая и противовирусная активность
	IFN-β	Бета-интерферон	Антивирусная, антибактериальная и противораковая активность
	IFN-γ	Гамма-интерферон	Стимулирует реакции CTL; антивирусная и антипролиферативная активность в трансформированных клетках
40	Интерлейкины		
	IL-1 бета	Бета-интерлейкин-1	Стимулирует созревание/пролиферацию В-клеток
	IL-2	Интерлейкин-2	Регулирует иммунную реакцию и пролиферацию Т-клеток
	IL-4	Интерлейкин-4	Активирует В-клетки
	IL-6	Интерлейкин-6	Дифференцировка В-клеток
	IL-10	Интерлейкин-10	Иммunosuppressорная и противовоспалительная активность
45	IL-12 эластин	Интерлейкин-12 (с эластиновым линкером между субъединицами)	Фактор роста для активированных Т-клеток и MNK-клеток; усиливает литическую активность NK/LAK-клеток
	IL-13	Интерлейкин-13	Противовоспалительный агент
	IL-15	Интерлейкин-15	Стимулирует пролиферацию Т-лимфоцитов и NK-клеток
	IL-16	Интерлейкин-16	Хемоаттрактант для CD4-лимфоцитов, моноцитов, дендритных клеток и эозинофилов
50	IL-18	Интерлейкин-18	Индукцирует IFN-γ и усиливает активность NK-клеток
	IL-18BPα	Связывающий белок интерлейкина-18, изоформа А	Ингибитор ранней реакции Th1-цитокинов
	IL-23	Интерлейкин-23	Стимулирует пролиферацию Т-клеток памяти; стимулирует продуцирование IFN-γ
	IL-24	Интерлейкин-24	

VIP	Вазоактивный кишечный пептид	Сосудорасширяющий агент; снижает артериальное кровяное давление; стимулирует сокращение миокарда; релаксант гладких мышц; активатор МФ; стимулирует пролиферацию Т-клеток
Надсемейство TNF		
LIGHT/TNFSF14	Член 14 надсемейства факторов некроза опухоли	Индукцирует апоптоз, стимулирует Т-клетки, подавляет образование опухоли in vivo
sTALL-1/TNFSF13B (именуемый также BlyS, BAFF, THANK)	Член 13В надсемейства факторов некроза опухоли	Стимулирует пролиферацию В-клеток
TNF $\alpha$ /TNFSF2	Альфа-фактор некроза опухоли	Цитолиз опухолевых клеток; индуцирует дифференцировку клеток
TWEAK/TNFSF12	Член 12 надсемейства факторов некроза опухоли (именуемый также Аро3L)	Индукцирует гибель опухолевых клеток, влияет на поведение астроцитов

Таблица 10  
Продуцирование NO в птичьей макрофаге, стимулированном очищенным рекомбинантным CGI

Линия клеток	Концентрация CGI (мкг)	Концентрация NO (мкМ)	Число дней после введения CGI
HD11 (один день)	12,5	40,68	13
HD11 (5 дней)	12,5	145,38	2
MQ-NCSU (один день)	1,0	30,41	5
MQ-NCSU (5 дней)	12,5	35,08	2

Таблица 11  
Продуцирование NO (мкМ) в птичьей макрофаге, обработанном 100 нг IFN- $\gamma$ , через три дня

Линия клеток	RCGI	BGI/ARC	CGI/ARC (серия 1)	CGI/ARC (серия 2)
HD11	[NO]=3,4	[NO]=17,2	[NO]=59,5	[NO]=81,1
MQ-NCSU	[NO]=17,8	[NO]=53,90	[NO]=76,5	[NO]=84,9

Таблица 12  
Продуцирование NO (мкМ) в птичьей макрофаге, обработанном 10 нг IFN- $\gamma$ , через четыре дня

Линия клеток	RCGI	BGI-ARC	CGI/ARC (серия 1)	CGI/ARC (серия 2)
HD11	[NO]=0,5	[NO]=2,4	[NO]=2,4	[NO]=16,8
MQ-NCSU	[NO]=6,7	[NO]=28,0	[NO]=53,8	[NO]=72,6

Таблица 13  
Иммунная реакция птиц на выделенный из растительной клетки HN в присутствии куриного IFN- $\gamma$  (CGI/ARC)

Описание экспериментальной группы	NDV HI GMT			
	14-й день	21-й день	35-й день	42-й день
pHN (20 мкг), подкожное введение	1	19	43	8
pHN (20 мкг) + CGI/ARC (25 мкг), подкожное введение	1	76	91	13
pHN (20 мкг) + CGI/ARC (25 мкг), подкожное введение, эмульсия масла в воде	2	38	71	17
Инактивированный вирус NDV, выделенный из аллантаиновой жидкости + CGI/ARC (25 мкг), подкожное введение	1	6	5	25
Контрольный образец NT + CGI/ARC (25 мкг), интраназальное, глазное и подкожное введение, эмульсия масла в воде	1	1	1	2

Формула изобретения

- Измененная рекомбинантная клетка (ARC), включающая клетки P.fluorescens MR324, которые содержат гетерологичный ген IFN- $\gamma$  и которые фиксированы раствором иод-люголя в уксусной кислоте.
- Клетка ARC по п.1, в которой гетерологичный ген IFN- $\gamma$  имеет бычье происхождение.
- Клетка ARC по п.1, в которой гетерологичный ген IFN- $\gamma$  имеет птичье происхождение.
- Клетка ARC по п.2, которая дополнительно содержит гетерологичный ген, кодирующий IFN- $\alpha$ .
- Клетка ARC по п.3, в которой указанный птичий IFN- $\gamma$  является куриным IFN- $\gamma$ .
- Клетка ARC по п.1, которая дополнительно содержит гетерологичный ген, кодирующий бычий IFN- $\alpha$ .
- Клетка ARC по п.1, которая дополнительно содержит носитель.
- Способ индукции иммунной реакции у субъекта на антиген или иммуноген, который предусматривает стадию введения субъекту:

измененных рекомбинантных клеток (ARC) по п.1 или композиции, включающей измененные рекомбинантные клетки (ARC) по п.1.

9. Способ по п.8, который дополнительно предусматривает введение представляющего интерес антигена.

5 10. Способ по п.9, который дополнительно предусматривает введение липополисахарида (LPS).

11. Способ по п.8, в котором указанный гетерологичный IFN- $\gamma$  имеет бычье происхождение.

10 12. Способ по п.8, в котором указанный гетерологичный IFN- $\gamma$  имеет птичье происхождение.

13. Способ по п.12, в котором указанный гетерологичный IFN- $\gamma$  является куриным IFN- $\gamma$ .

14. Способ по любому из пп.8-11 или 12, в котором указанная клетка ARC дополнительно содержит бычий IFN- $\alpha$ .

15 15. Способ по любому из пп.8-14, в котором клетки ARC коэкспрессируют по меньшей мере один представляющий интерес антиген.

16. Способ лечения опухолей, рака или злокачественных новообразований, который предусматривает введение субъекту:

а) измененных рекомбинантных клеток (ARC) по п.1 или

20 б) композиции, включающей измененные рекомбинантные клетки (ARC) по п.1, в количествах, достаточных для лечения опухолей, рака или злокачественных новообразований.

17. Способ по п.16, который дополнительно предусматривает введение химиотерапевтических средств и, необязательно, опухолевых или раковых антигенов.

25 18. Способ модуляции иммунного ответа у субъекта или усиления сопротивляемости организма субъекта вирусной инфекции, который предусматривает введение указанному субъекту:

а) измененных рекомбинантных клеток (ARC) по п.1 или

б) композиции, включающей измененные рекомбинантные клетки (ARC) по п.1.

30 19. Способ получения измененной рекомбинантной клетки (ARC) по п.1, который предусматривает следующие стадии:

а) введение в клетки *P.fluorescens* MR324 гетерологичного гена IFN $\gamma$ ;

б) выращивание указанной клетки в питательной среде;

в) сбор указанных клеток и

35 д) инактивацию или фиксацию указанных клеток раствором иод-люголя в уксусной кислоте.

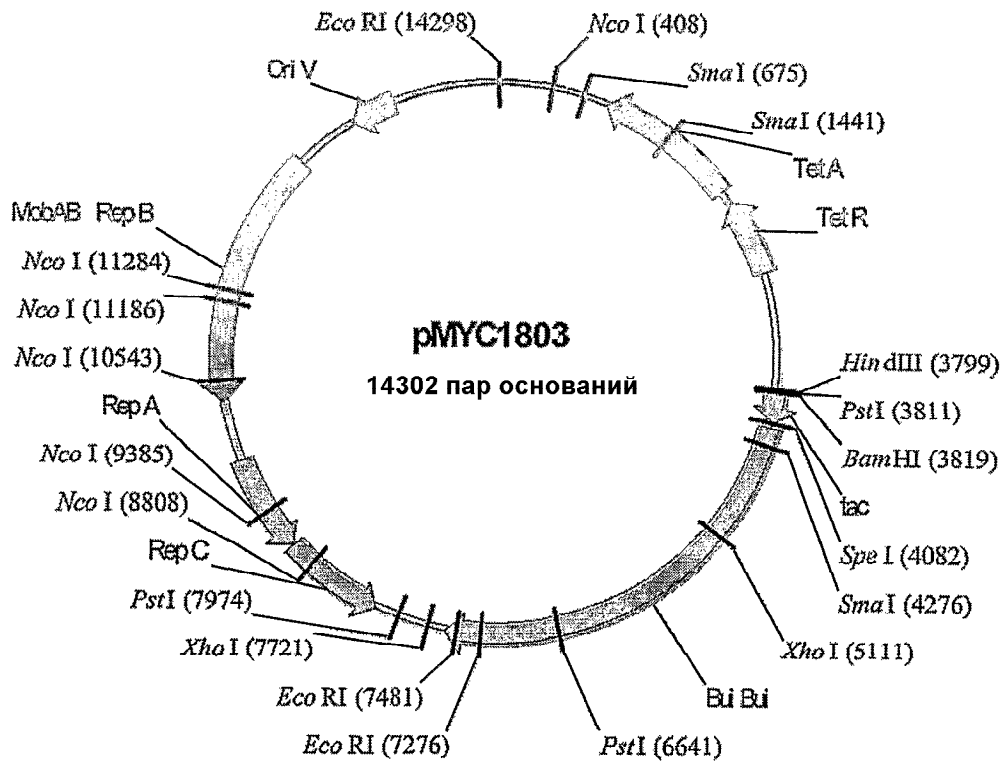
20. Способ по п.19, в котором указанный гетерологичный ген IFN- $\gamma$  имеет бычье происхождение.

40 21. Способ по п.19, в котором указанный гетерологичный ген IFN- $\gamma$  имеет птичье происхождение.

22. Способ по любому из пп.19-21, дополнительно предусматривающий введение гетерологичного гена, кодирующего бычий IFN- $\alpha$ , в указанные клетки.

45

50



ФИГ. 1

```

agagaactagtaaaaaaggagaaatccATGCAGGGCCAATTTTTTAGA
1 -----+-----+-----+-----+----- 47
tctcttgatcatttttctcttttaggtACGTCCCGTTAAAAAATCT

M Q G Q F F R

GAAATAGAAAACCTTAAAGGAGTATTTTAATGCAAGTAGCCCAGATGTAGCTAAGGGTGGG
48 -----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 107
CTTTATCTTTTGAATTCCTCATAAAATTACGTTCATCGGGTCTACATCGATTCCCACCC

E I E N L K E Y F N A S S P D V A K G G

CCTCTCTTCTCAGAAATTTGAAGAATTGGAAGATGAAAGTGACAAAAAATTATTTCAG
108 -----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 167
GGAGAGAAGAGTCTTTAAAACTTCTTAACTTTCTACTTTCACTGTTTTTTAATAAGTC

P L F S E I L K N W K D E S D K K I I Q

AGCCAAATTGTCTCCTTCTACTTCAAACCTTTGAAAACCTCAAAGATAACCAGGTCATT
168 -----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 227
TCGGTTTAAACAGAGGAAGATGAAGTTTGAGAACTTTTGAGATTTCTATTGGTCCAGTAA

S Q I V S F Y F K L F E N L K D N Q V I

CAAAGGAGCATGGATATCATCAAGCAAGACATGTTTCAGAAGTTCTTGAATGGCAGCTCT
228 -----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 287
GTTTCTCGTACCTATAGTAGTTTCTGTACAAAGTCTTCAAGAACTTACCGTCGAGA

Q R S M D I I K Q D M F Q K F L N G S S

GAGAAACTGGAGGACTTCAAAAAGCTGATTCAAATTCGGGTGGATGATCTGCAGATCCAG
288 -----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 347
CTCTTTGACCTCCTGAAGTTTTTCGACTAAGTTTAAAGGCCACCTACTAGACGTCTAGGTC

E K L E D F K K L I Q I P V D D L Q I Q

CGCAAAGCCATAAATGAACTCATCAAAGTGATGAATGACCTGTCACCAAATCTAACCTC
348 -----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 407
GCGTTTCGGTATTTACTTGAGTAGTTTCACTACTTACTGGACAGTGGTTTTAGATTGGAG

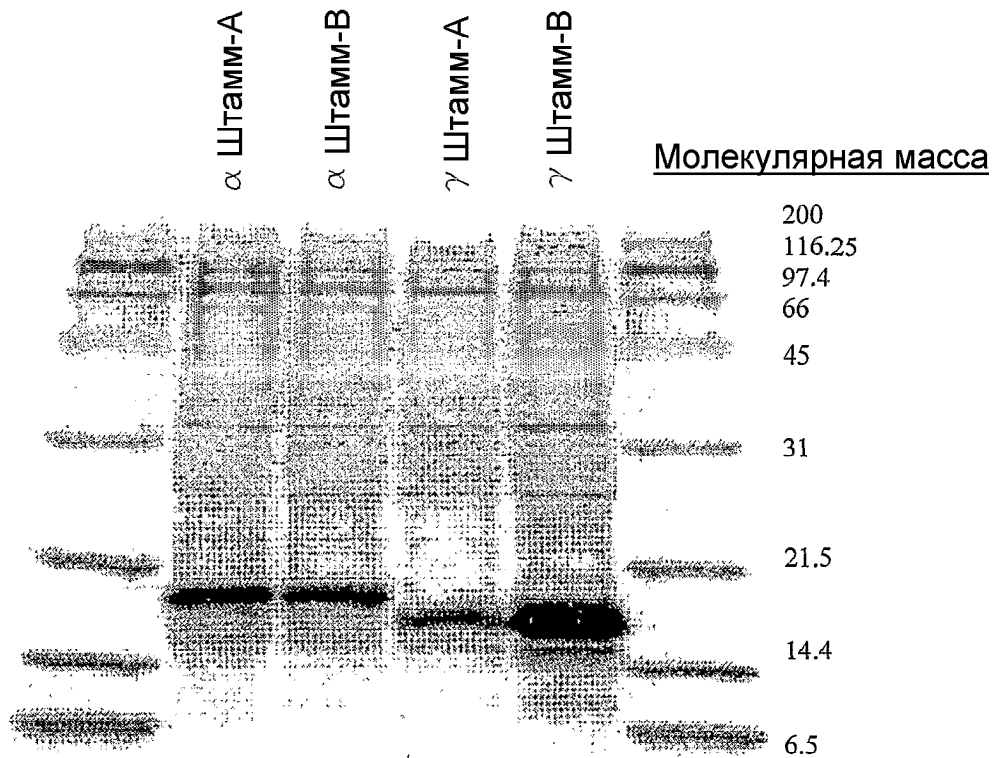
R K A I N E L I K V M N D L S P K S N L

AGAAAGCGGAAGAGAAGTCAGAATCTCTTTCGAGGCCGGAGAGCATCAACGtaatgactcgagtctct
408 -----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 475
TCTTTTCGCCTTCTCTTCACTTCTTAGAGAAAGCTCCGGCCTCTCGTAGTTGCattactgagctcagaga

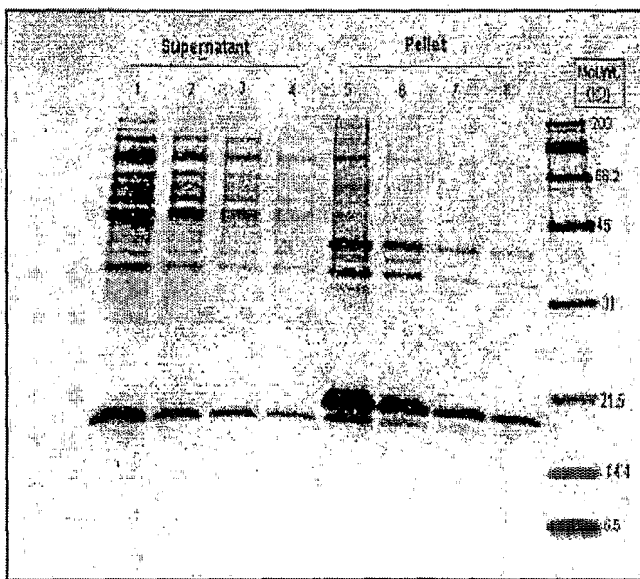
R K R K R S Q N L F R G R R A S T *

```

ФИГ. 2



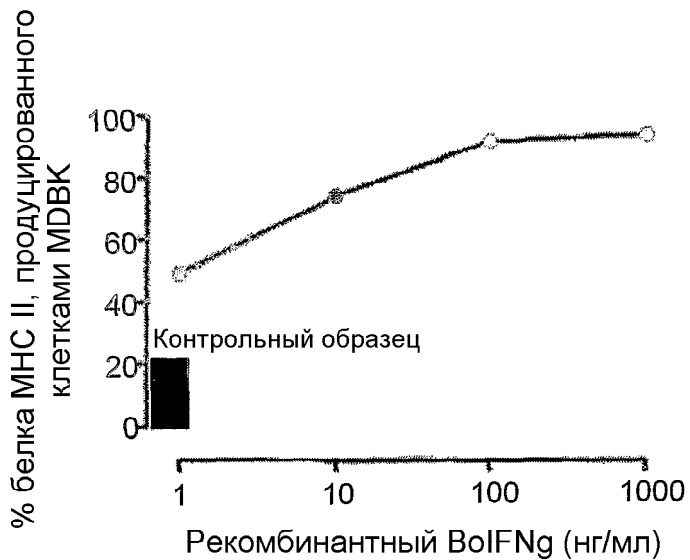
ФИГ. 3



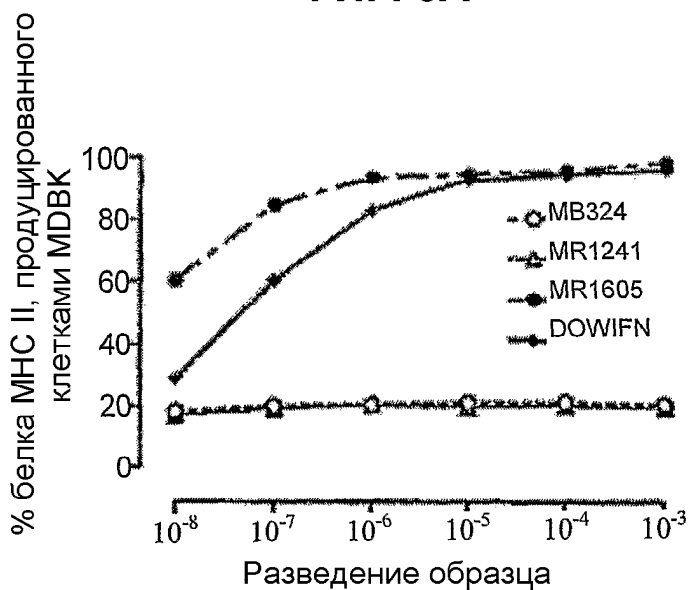
ФИГ. 4

<b>Анализ устойчивости BGI/ARC</b>				
<b>Показатели для образцов, хранившихся при -80°C, с указанием содержания в них соответствующих белков и значений активности</b>				
<b>Температура воздействия</b>	<b>Название образца</b>	<b>Периоды времени</b>	<b>Безличины сканирования в геле</b>	<b>Титр активности образца (усредненный)</b>
-20°C	A1	2 дня	2051,3	100000
-20°C	A2	4 дня	2051,4	100000
-20°C	A3	8 дней	1586,8	200000
-20°C	A4	17 дней	1851,9	300000
-20°C	A5	3 месяца	1959,7	300000
-20°C	A6	6 месяцев	2059,5	300000
4°C	B1	2 дня	1967,1	300000
4°C	B2	4 дня	2194,1	300000
4°C	B3	8 дней	2119	300000
4°C	B4	17 дней	1914,6	200000
4°C	B5	3 месяца	2083,8	300000
4°C	B6	6 месяцев	2415,8	300000
Комнатная температура	C1	2 дня	3336,7	165000
Комнатная температура	C2	4 дня	2686,9	300000
Комнатная температура	C3	8 дней	2469,9	300000
Комнатная температура	C4	17 дней	2723	200000
Комнатная температура	C5	3 месяца	2966,3	20000
Комнатная температура	C6	6 месяцев	2803,1	30000
37°C	D1	2 дня	2127,6	65000
37°C	D2	4 дня	2711,1	200000
37°C	D3	8 дней	2674,6	65000
37°C	D4	17 дней	2958,9	65000
37°C	D5	3 месяца	1524,8	20000
37°C	D6	6 месяцев	1099,7	65000
Нет данных	E1	T=0	3021,3	30000
Нет данных	E2	CGI	Нет данных	6500
Хранение при -20°C	Положительный контрольный образец	Нет данных	Эквивалентна E1	200000
Хранение при -20°C	Отрицательный контрольный образец	Нет данных	0	1000

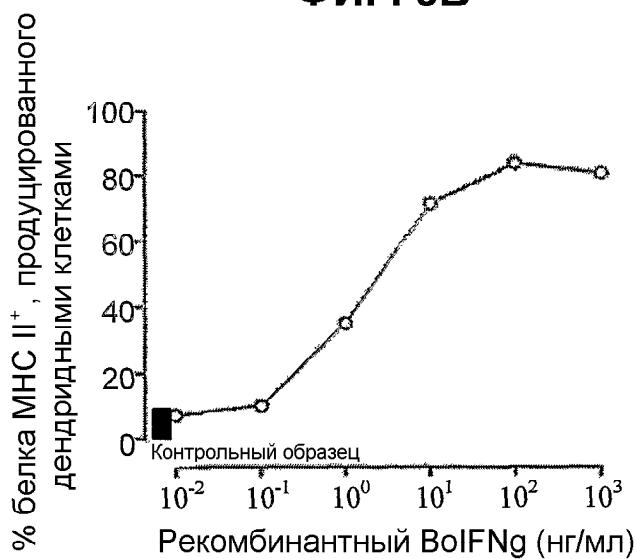
ФИГ. 5



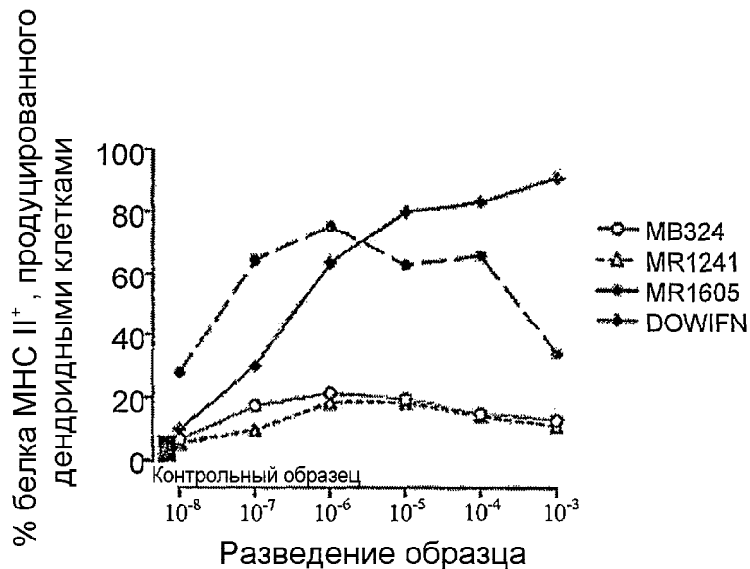
ФИГ. 6А



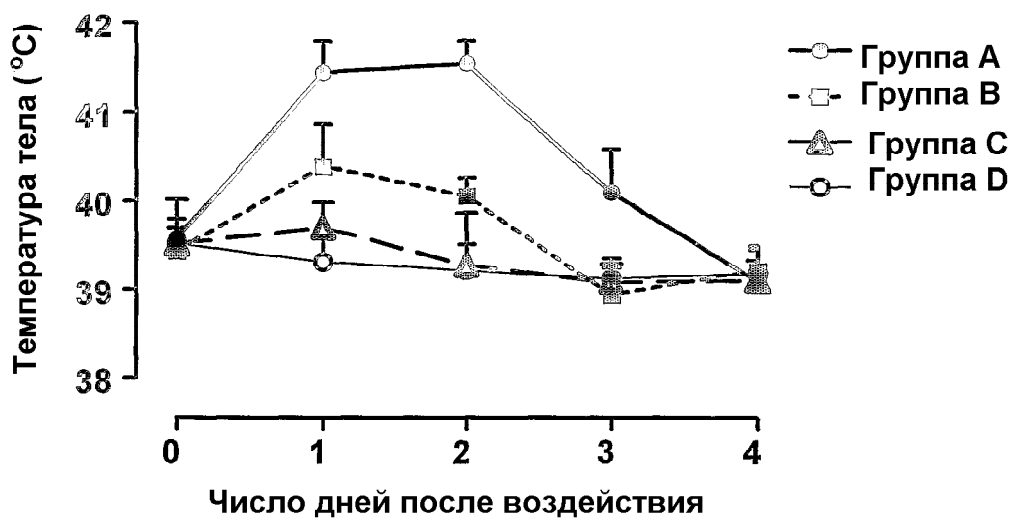
ФИГ. 6В



ФИГ. 7А

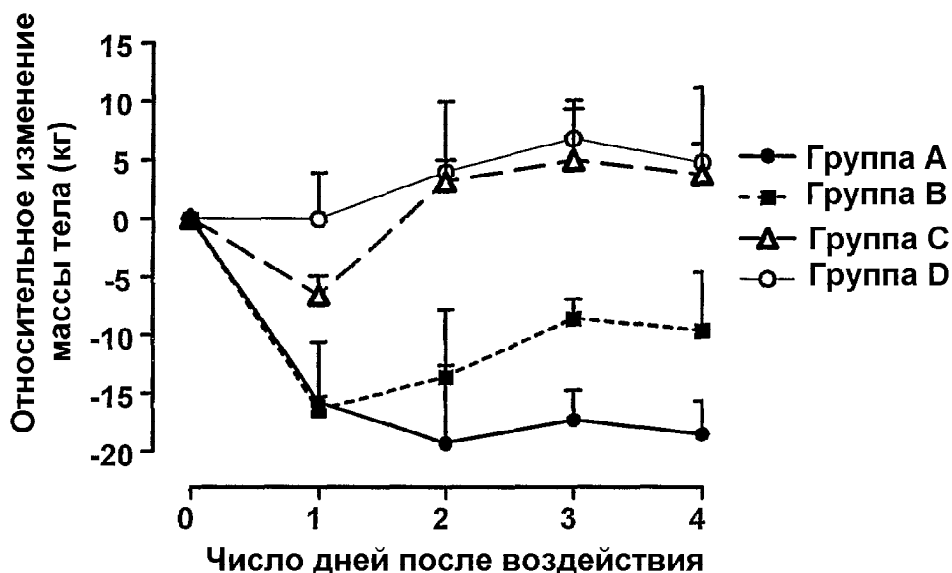


**ФИГ. 7В**  
Влияние VG/ARC на температуру тела



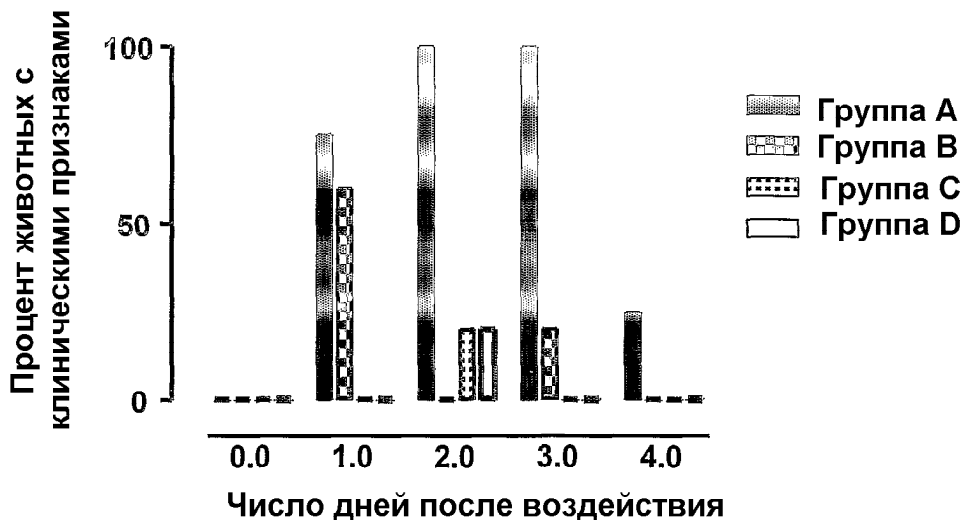
**ФИГ. 8**

Влияние BGI/ARC на массу тела (BW)



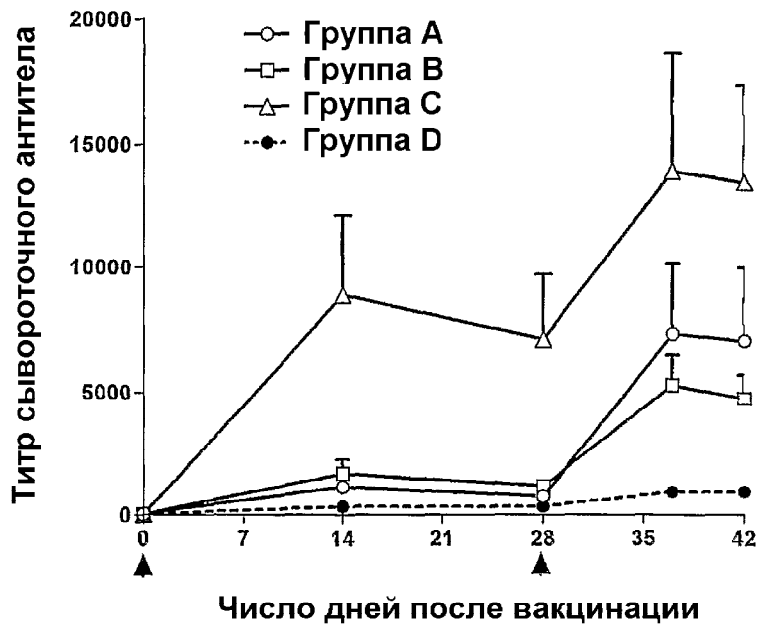
ФИГ. 9

Клинические реакции на однократную дозу BGI/ARC



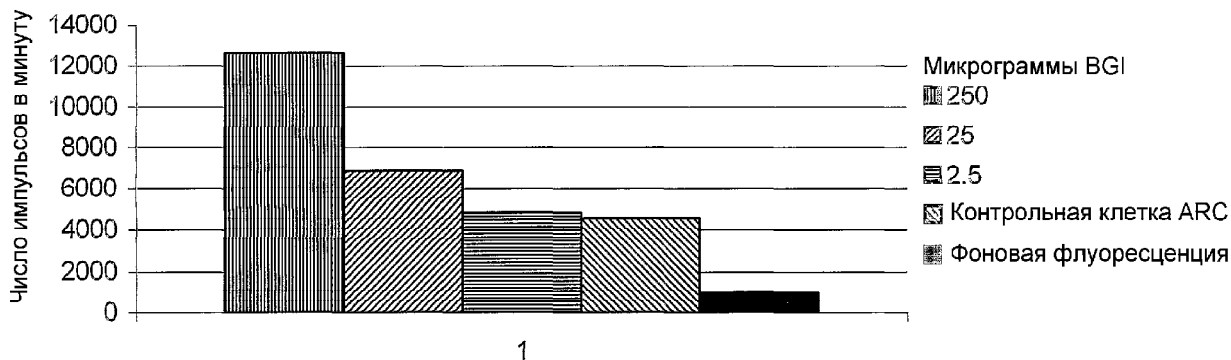
ФИГ. 10

Реакции PSA-специфического антитела

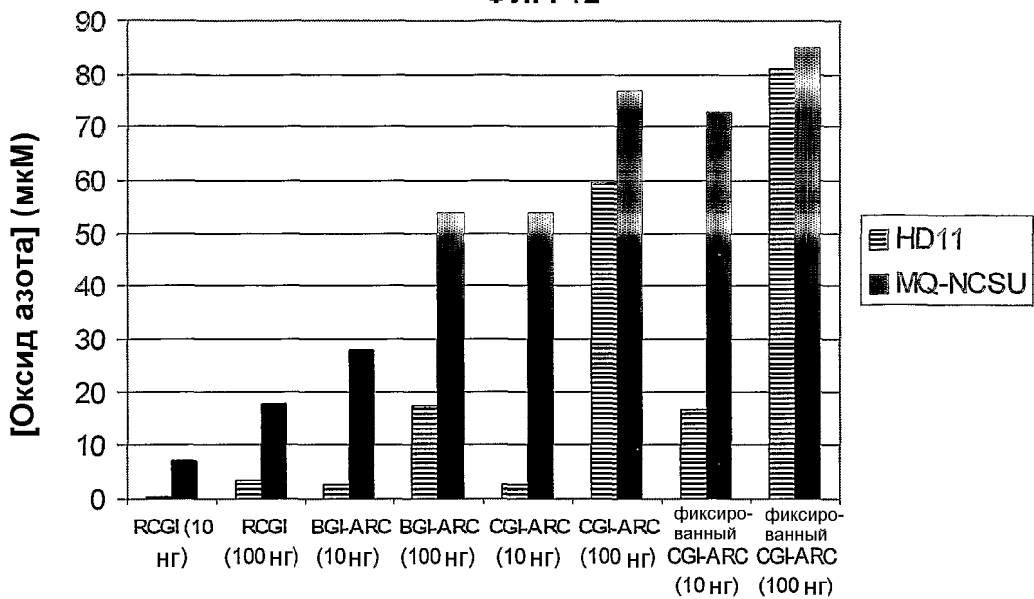


**ФИГ. 11**  
Пролиферация лимфоцитов под действием BGI/ARC

Введение 3H тимидина



**ФИГ. 12**



**ФИГ. 13**