



**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: **2009122560/10**, **13.11.2007**

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
13.11.2007

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
13.11.2006 EP 06123974.5
13.11.2006 US 60/865,484
21.05.2007 US 60/939,140

(43) Дата публикации заявки: **20.12.2010** Бюл. № 35

(45) Опубликовано: **10.04.2012** Бюл. № 10

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: **WO 9823763 A1**, **04.06.1998. RU 2092556 C1**, **10.10.1997. RU 2216590 C1**, **20.11.2003.**

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на национальной фазе: **15.06.2009**

(86) Заявка РСТ:
EP 2007/062237 (13.11.2007)

(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2008/058944 (22.05.2008)

Адрес для переписки:
127055, Москва, а/я 11, пат.пов.
Н.К.Попеленскому, рег. № 31

(72) Автор(ы):

ГЕНТШЕВ Ивайло (DE),
ГОЭБЕЛЬ Вернер (DE),
РАПП Ульф Р. (DE),
ФЕНСТЕРЛЕ Иоахим (DE)

(73) Патентообладатель(и):

Этерна Центарис ГмбХ (DE)

(54) МИКРООРГАНИЗМ-НОСИТЕЛЬ НУКЛЕОТИДНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ, КОДИРУЮЩИХ АНТИГЕНЫ И БЕЛКОВЫЕ ТОКСИНЫ

(57) Реферат:

Изобретение относится к микроорганизму-носителю нуклеотидных последовательностей, кодирующих антигены и белковые токсины, включающему первый компонент, представленный по меньшей мере одной нуклеотидной последовательностью, кодирующей по меньшей мере один полный или неполный антиген по меньшей мере одного белка дикого типа или мутантного белка, второй компонент, представленный по меньшей мере одной нуклеотидной последовательностью, кодирующей по меньшей мере один белковый токсин и/или по меньшей мере одну субъединицу

белкового токсина, третий компонент, состоящий по меньшей мере из одного первого подкомпонента, представленного по меньшей мере одной нуклеотидной последовательностью, кодирующей по меньшей мере одну систему транспорта, которая облегчает экспрессию продуктов экспрессии первого и второго компонентов на наружной поверхности микроорганизма и/или облегчает секрецию продуктов экспрессии первого и второго компонентов, и/или кодирующей по меньшей мере одну сигнальную последовательность, которая облегчает секрецию продуктов экспрессии первого и второго компонентов,

и/или, необязательно, из второго подкомпонента, представленного по меньшей мере одной нуклеотидной последовательностью, кодирующей по меньшей мере один белок для лизиса микроорганизма в цитозоле клеток млекопитающих и для внутриклеточного высвобождения плазмид или векторов экспрессии, которые содержатся в лизированном микроорганизме, и четвертый компонент, представленный по меньшей мере одной нуклеотидной последовательностью для по меньшей мере одной последовательности активации для экспрессии по меньшей мере одного из первого, второго и третьего компонентов, где указанная последовательность активации может быть активирована в микроорганизме и/или является специфической для клетки ткани, специфической для опухолевой клетки, макрофаг-специфической, дендрит-специфической, лимфоцит-специфической,

функция-специфической или неспецифической в отношении клетки, причем любой первый, второй, третий или четвертый компоненты, представленные в микроорганизме более одного раза, являются независимо друг от друга идентичными или отличающимися, при этом первый и второй компонент отличны друг от друга. Кроме того, описаны лекарственное средство для стимулирования иммунного ответа и фармацевтическая композиция на основе указанного микроорганизма, способы получения указанного микроорганизма, соответствующие экспрессионная плаزمид и вектор экспрессии для получения указанного микроорганизма. Изобретение позволяет получать новые противоопухолевые вакцины, которые индуцируют сильный системный клеточный ответ иммунной системы, что повышает эффективность противоопухолевой терапии. 9 н. и 12 з.п. ф-лы, 18 ил., 8 пр.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.

C12N 1/21 (2006.01)*C12N 15/63* (2006.01)*C12N 15/74* (2006.01)*C07K 14/195* (2006.01)(12) **ABSTRACT OF INVENTION**(21)(22) Application: **2009122560/10, 13.11.2007**(24) Effective date for property rights:
13.11.2007

Priority:

(30) Priority:

13.11.2006 EP 06123974.5**13.11.2006 US 60/865,484****21.05.2007 US 60/939,140**(43) Application published: **20.12.2010 Bull. 35**(45) Date of publication: **10.04.2012 Bull. 10**(85) Commencement of national phase: **15.06.2009**

(86) PCT application:

EP 2007/062237 (13.11.2007)

(87) PCT publication:

WO 2008/058944 (22.05.2008)

Mail address:

127055, Moskva, a/ja 11, pat.pov.**N.K.Popelenskomu, reg. № 31**

(72) Inventor(s):

GENTShEV Ivajlo (DE),**GOEhBEL' Verner (DE),****RAPP Ul'f R. (DE),****FENSTERLE Ioakhim (DE)**

(73) Proprietor(s):

Ehterna Tsentaris GmbKh (DE)(54) **ANTIGEN AND PROTEIN TOXIC CODING NUCLEOTIDE SEQUENCE CARRIER MICROORGANISM**

(57) Abstract:

FIELD: chemistry.

SUBSTANCE: microorganism, which codes antigens and protein toxins, contains a first component, which is at least one nucleotide sequence coding at least at least one complete or partial antigen of at least one wild-type or mutated protein, a second component which is at least one nucleotide sequence coding for at least one protein toxin and/or at least one protein toxin subunit, a third component consisting of at least a first subcomponent which is at least one nucleotide sequence coding at least one transport system which enables the expression of the first and second components on the outer surface of the microorganism and/or enables the secretion of the expression products of the first and second components, and/or coding at least one signal sequence which enables the secretion of the expression products of the first and second

components, and/or optionally, from the second subcomponent, which is at least one nucleotide sequence coding at least one protein for lysing the microorganism in the cytosol of mammalian cells and for intracellularly releasing plasmids or expression vectors, which are contained in the lysed microorganism; and a fourth component which is at least one nucleotide sequence for at least one activation sequence for the expression of one or more of the first, second and third components, wherein said activation sequence can be activated in the microorganism and/or is tissue cell-specific, tumour cell-specific, macrophage-specific, dendrite-specific, lymphocyte-specific, function-specific or non-cell-specific, wherein any of the first, second, third or fourth components, present in the microorganism more than once, are independently identical or different, wherein the first and second components are different from each other. Also

disclosed are a medicinal agent for stimulating immune response and a pharmaceutical composition based on said microorganism, methods of obtaining said microorganism, the corresponding expression plasmid and expression vector for obtaining said microorganism.

EFFECT: invention enables to obtain novel antitumour vaccines, which induce a strong systemic cellular immune system response, which increases effectiveness of antitumour therapy.

21 cl, 22 dwg, 8 ex

RU 2 4 4 7 1 4 5 C 2

RU 2 4 4 7 1 4 5 C 2

Область техники, к которой относится изобретение

Изобретение относится к микроорганизмам как носителям гетерогенных нуклеотидных последовательностей, кодирующих антигены и белковые токсины, способу их получения, а также соответствующим плазмидам или векторам экспрессии. Данные микроорганизмы можно использовать как лекарственные средства, в частности, как противоопухолевые вакцины для лечения различных опухолей.

Уровень техники

Иммунотерапия рака дает многообещающую возможность лечения опухолей. Множество клинических исследований с использованием различных подходов сосредоточивается на ее эффективности у пациентов. В принципе показано различие между пассивной и активной иммунотерапией.

Активная иммунотерапия направлена на индукцию связанного с вакциной опухолеспецифического иммунного ответа. Последний в настоящее время исследуют в клинических условиях с использованием ряда различных подходов. Например, имеются так называемые цельноклеточные вакцины, исходным материалом для которых являются опухолевые клетки, которые либо получают непосредственно от пациента (аутологичные) или выделяют из соответствующих клеточных линий (гетерологичные). Затем данные клетки, как правило, инактивируют, дифференцированно проводят манипуляции и вводят (обратно вводят) пациенту.

Напротив, антигенспецифические вакцины включают один или более опухолеспецифических антигенов, частей антигенов или ДНК, кодирующую специфический антиген, а также так называемые антиидиотипические вакцины. Обычно данные вакцины не являются выделенными, но их инъецируют в комбинации с подходящим носителем. Следовательно, с одной стороны, используют различные классические адъюванты, но также используют комбинации с биологическими иммуностимуляторами, такими как цитокины.

С целью иммуностимуляции используют подходы, которые включают антиген-ассоциированные иммуностимуляторы, такие как столбнячный токсин. Более того, имеются попытки использования антигенов в комбинации с дендритными клетками. И, наконец, имеется ряд попыток использования рекомбинантных живых вакцин с вирусными или бактериальными носителями.

Слитые белки бактериальных токсинов, такие как столбнячный токсин, шига-токсин, летальный токсин или холерный токсин, в качестве адъювантов с антигеном используют как вакцины, особенно противoinфекционные, уже давно (см. статью Freytag и Clements, 1999). Кроме того, нативные токсины, часто слитые со специфической в отношении клетки молекулой-мишенью, такой как молекула клеточной поверхности опухолевых клеток, также используют с целью разрушения клеток-мишеней.

В таком случае, слитые белки с нативным токсином, который, как правило, включает ферментную группу и белок-связывающий домен, проявляют свой оптимальный эффект при использовании в качестве вспомогательных лекарственных веществ (см. статью Freytag и Clements, 1999). С помощью данных вакцин получают удовлетворительный иммунный ответ даже после иммунизации через слизистые и особенно после пероральной иммунизации. Сложности с данными слитыми белками заключаются в том, что нативные токсины являются высокотоксичными и, вследствие этого, не могут быть использованы для человека (см. статью Holmgren et al., 2005).

Целое направление исследований, таким образом, занимается детоксификацией токсинов, которые в то же время сохраняют эффект в качестве вспомогательных лекарственных веществ. Однако, поскольку в большинстве случаев данный эффект совпадает с ферментной активностью, которая ответственна за токсический эффект (см. статью Lyske et al., 1992), детоксификация не может быть проведена прямым путем, даже если это представляется возможным для некоторых токсинов, которые не теряют своей ферментной адъювантной активности (см. статьи Hormozi et al., 1999; Lyske et al., 1992).

В случае холерного токсина (СТ) предпринят ряд попыток детоксификации (см. статьи Agren et al., 1999; Byun et al., 2001; Eriksson et al., 2004; Kweon et al., 2002; Sanchez et al., 2002), в которых, однако, преобладает использование вспомогательного лекарственного вещества для слизистых (см. работы Freytag и Clements). Вследствие этого главным образом эффективная индукция ответа антител (в основном IgA слизистых), которые получают усиленную связанную с токсином поддержку Т-клеток с рестрикцией МНС (главного комплекса гистосовместимости) класса II, является основным предварительным условием для вспомогательного лекарственного средства для слизистых для вакцины, которая состоит из белка-антигена и слитого или совместно используемого токсина (см. статью Freytag и Clements).

Что касается холерного токсина, особенно его В-субъединицы (CtxB), то его тестируют как адъювант, поскольку он является ответственным за связывание с рецептором GM-1 и не проявляет токсических эффектов, будучи выделенным (см. статью Holmgren et al.). Слияния белка с CtxB характеризуются в основном индукцией так называемых Th2 иммунных ответов. Они представляют собой Т-клеточные ответы, которые главным образом характеризуются цитокинами, такими как ИЛ-4 или ИЛ-6, и которые в основном вызывают индукцию антител, но которые совсем не иницируют или наиболее ограниченно иницируют клеточный иммунный ответ, в частности, цитотоксических Т-клеток (CTL) (см. статью Holmgren et al.).

Кроме того, CtxB в качестве адъюванта для слизистых индуцирует системную толерантность к белку-антигену. Системная толерантность описывает истощение или инактивацию антиген-специфических лимфоцитов, в частности, Т-клеток или В-клеток. Подход данного типа, вследствие этого, неприменим для индукции системного иммунного ответа (см. статью Holmgren et al.).

В противоположность применению на слизистых внутрибрюшинное или подкожное применение слитого белка токсин-антиген способно индуцировать системный, а также низкий цитотоксический ответы. Это в действительности используют для противоопухолевой вакцинации в модельных системах (см., например, работу (Vecerra et al., 2003)). Однако данный ответ также получают с самим очищенным антигеном и главным образом в зависимости от используемого адъюванта. За исключением того факта, что измеренные ответы CTL на модели являются очень низкими, отсутствуют доказательства того, что защита в той же мере зависит от данных эффектов. Более того, антиген не применяют перорально, но только путем прямой инъекции (s.c. (подкожной), i.d. (внутрикожно), i.m. (внутримышечно), i.p. (внутрибрюшинно)) антигена.

Антигенные белки, слитые с детоксифицированным токсином, как правило, неэффективны при применении в качестве противоопухолевой вакцины. Основными причинами являются, если они вообще имеются, лишь низкая индукция системного иммунного ответа или даже, в случае CtxB, индукция системной толерантности, а

также индукция ограниченных слизистой антител и иммунных ответов типа Th2.

В статье McSorley et al., например, показано, что назальная иммунизация слитым белком CtxB-антиген (который для противоопухолевой вакцины представляет предпочтительный путь индукции системного ответа) предпочтительно переносится и, вследствие этого, инактивирует Th1-клетки, тогда как Th2-клетки не подвергаются воздействию (см. статью McSorley et al., 1998). Ответы Th2 характеризуются Т-хелперными клетками, которые преимущественно продуцируют ИЛ-4 или ИЛ-6. Данные цитокины особенно ответственны за инициацию продукции антител В-клетками, которые обеспечивают защиту в случае самых распространенных вакцин. Напротив, Т-клетки Th1 в основном секретируют ИЛ-2 и ИФН- γ соответственно цитокины, которые играют роль в клеточном иммунном ответе. В зависимости от цели стратегии иммунизации имеет большое значение, инициируется ли вызываемый антителами иммунный ответ Th2 (так называемый сдвиг Th2) или вызываемый клетками ответ Th1 (так называемый сдвиг Th1).

Напротив, системная индукция Th1-доминирующего клеточного иммунного ответа с помощью ИФН- γ , дающая Т-клетки хелперы, и индукция цитотоксических Т-клеток (CTL) является необходимой для иммунотерапии опухолей.

Предшествующий уровень техники показывает, что токсины могут действовать как адъюванты. В частности, холерный токсин (СТ) показывает сильный адъювантный эффект. Однако данный эффект существенно ослабляется, как только токсин детоксифицируют. Что касается его субъединицы CtxB, пероральное применение даже индуцирует системную толерантность. Данной проблемы можно частично избежать путем назального применения. Однако если используют назальное введение, возникают другие проблемы, в частности, такие как ассоциированные с субъединицей CtxB, затрагивающие экспрессию рецептора GM-1 в головном мозге (см. статью van Ginkel et al., 2000), которые выражаются в повышенном риске развития определенных тяжелых побочных эффектов (см. статью Mutsch et al., 2004).

Для преодоления данных проблем возможно генерировать рекомбинантные живые вакцины, которые соэкспрессируют токсины и (гетерологичные) антигены. Данная возможность уже рассматривалась в связи с противоинфекционными вакцинами, т.е. вакцинами, которые направлены на специфический патоген, например на возбудитель туберкулеза, и предназначены для индукции иммунитета против данного патогена.

В процессе разработки данных противоинфекционных вакцин уже получены рекомбинантные токсины, слитые с соответствующими (гетерологичными) антигенами, с использованием ряда рекомбинантных бактериальных штаммов, которые вводят перорально как в случае живой, так и инактивированной вакцины. В большинстве случаев генерированные штаммы экспрессируют только рекомбинантный токсин. Вследствие этого данные подходы в основном направлены на иммунизацию исключительно против самого токсина (индукцию ответа антител) и, следовательно, штамма, экспрессирующего токсина (патогена). Данные типы вакцин непригодны для применения в качестве потенциальных противоопухолевых вакцин при лечении опухолей и неудивительно, что в соответствующих испытаниях не упоминают о какой-либо возможности данного применения (см. статью Reveneau et al., 2002), (см. статью Vertiev et al., 2001), (см. статьи Freytag и Clements, 1999; Jackson et al., 1996).

Что касается данных противоинфекционных вакцин, в процессе индукции ответа

антител токсин не работает как адъювант, в данном случае преобладает индукция иммунного ответа антител слизистых. Данные испытания противоиnфекционных вакцин не включают или включают только очень слабый системный иммунный ответ. В противоположность противоопухолевым вакцинам данные вакцины не осуществляют индукцию клеточного иммунного ответа, особенно цитотоксических Т-клеток. Бактериальные патогены, экспрессирующие токсин, обычно относятся к внеклеточному живому типу и, вследствие этого, не участвуют в активации СТL, т.е. защита, представляемая данными противоиnфекционными вакцинами, является СТL-независимой.

В упомянутых испытаниях вакцин использованы следующие бактериальные штаммы: рекомбинантные *Lactobacilli* (см. статью Reveneau et al., 2002), *Listeria* (см. статью Vertiev et al., 2001), *Bacillus anthracis* (см. статьи Mendelson et al., 2005; Mesnage et al., 1999), *Shigellae* (см. статьи Andersen et al., 2000; Tzschaschel et al., 1996b), *E. coli* (см. статью Walker et al., 1992), *Vibrio* (см. статьи Butters et al., 1995; Chen et al., 1998; Thungapathra et al., 1999) и *Salmonella* (см. статью Jackson et al., 1996).

Кроме того, пытались усилить иммунные ответы слизистых путем поверхностной презентации (см. статью Konieczny et al., 2000) или секреции токсина в качестве гетерологичного антигена (*Salmonella*, *Shigellae* (см. статьи Garmory et al., 2003; Orr et al., 1999; Su et al., 1992; Tzschaschel et al., 1996a; Tzschaschel et al., 1996b), *Yersinia* (см. статью Sory и Cornelis, 1990), *Vibrio* (см. статью Ryan et al., 1997a), *E. coli* (см. статью Zhu et al., 2006)). Однако в данных дополнительных случаях сами токсины представляют антигены, в отношении которых направлен иммунный ответ.

Таким образом, следует отметить, что токсины не действуют как адъюванты и в описанных исследованиях не планируют экспрессировать токсины в виде слитых белков с дополнительным отдельным (гетерологичным) антигеном. Более того, слитые белки с СТ или СtxB не были генерированы с данными системами, и это не предполагалось.

Следовательно, слитые белки, упомянутые в вышеприведенных документах, представляют собой слитые белки пептидного сигнала секреции, такого как НlyA, и белка токсина, а не слитые белки, состоящие из токсина и (гетерологичного) антигена.

Главной целью данных исследований является просто получить оптимальный иммунный ответ слизистых (см. статью Tzschaschel et al., 1996a). Индукцией системного иммунного ответа не занимаются. До настоящего времени, если сравнивать в целом, анализы системных иммунных ответов были ограничены только антителами (в частности, системными IgA), поскольку защита в моделях данного типа главным образом опосредуемая антителами (ср., например, [31]). Индукция системного клеточного иммунного ответа, в частности ответа цитолитических Т-клеток, не описана. Слияние с сигналом секреции в основном использовали для повышения растворимости токсинов и повышения их стабильности соответственно, поскольку сильная абсолютная цитоплазматическая экспрессия часто приводит в результате к продукции нерастворимых агрегатов (см. статью Gentshev et al., 2002a).

В данном аспекте ряд авторов обращает внимание на то, что белки с сигналом секреции вызывают быстрое цитоплазматическое разложение (см. статью Tzschaschel et al., 1996a), тогда как другие наблюдают стабилизацию (см. статью Orr et al., 1999). Предшествующий уровень техники, следовательно, в данном случае имеет противоречия. До настоящего времени предшествующие эксперименты с секретируемыми токсинами (токсин + сигнал секреции), прежде всего, направлены на

повышение стабильности, которая очевидным образом не достигается во всех случаях.

Одна причина безусловно обнаружена в изменяющейся интенсивности экспрессии и стабильности плазмид. В статье Tzschaschel et al. описано, что используемая
5 плазмидная система высоко нестабильна и, кроме того, без селекции просто найдена в нескольких бактериях. В качестве возможного решения авторы используют хромосомную интеграцию посредством минитранспозона (см. статьи Tzschaschel et al., 1996a; Tzschaschel et al., 1996b).

Однако данная система имеет ряд недостатков. С одной стороны, точка интеграции не определена, что может привести к нежелательному фенотипическому изменению штамма-хозяина (например, повышенной/пониженной экспрессии
10 фланкирующих генов). С другой стороны, ожидаемый уровень экспрессии при использовании одной геномной копии только низкий, что оказывает отрицательное
15 воздействие на иммуногенность. Кроме прочего, хромосомная интеграция транспозона относительно нестабильна, поскольку она очень часто приводит к спонтанным эксцизиям по сторонам повторяющихся элементов.

Как отмечено выше, предшествующий уровень техники является противоречивым
20 в отношении стабильности секретируемого гетерологичного токсина.

В статье Garmory et al. даже предполагают, что секреция гетерологичного антигена не обладает каким-либо особенным преимуществом в отношении иммуногенности (см. статьи Garmory et al., 2002; Roland et al., 2005). В других случаях
25 повышенный системный ответ антител на секретируемый токсин после внутривенного введения в действительности наблюдают, но не после перорального введения. Напротив, пероральное введение, пусть даже косвенно, является частью проблемы (см. статью Roland et al., 2005).

В конечном счете исследования с грамположительным штаммом (*Lactobacillus plantarum*), который продуцирует столбнячный токсин, не показывают существенных
30 различий в индукции системного ответа антител по сравнению со штаммами, которые секретируют токсин, присутствует ли он в связанном с их мембраной виде, или они содержат токсин в цитоплазме (см. статью Reveneau et al., 2002).

Системные клеточные иммунные ответы, в частности ответы цитотоксических Т-клеток, и полученная в результате защита не исследованы и не описаны.
35

Таким образом, на основании вышеприведенных данных по предшествующему уровню техники, касающихся противоифекционных вакцин на основе токсинов, нельзя утверждать, представляет ли секреция токсина, используемого в качестве
40 адъюванта, преимущество в плане индукции системного (клеточного) иммунного ответа. Напротив, вышеприведенные исследования скорее указывают на проблему стабильности и отмечают потерю положительного эффекта секретируемого гетерологичного токсина. Слитые белки, состоящие из сигнала, токсина и гетерологичного антигена, совсем не описаны или не предполагаются.

В вышеприведенных абзацах представлен предшествующий уровень техники, который описывает бактериальные носители, которые гетерологично экспрессируют
45 токсины и могут быть использованы в качестве противоифекционных вакцин. В приведенных примерах осуществлены в основном модификации, касающиеся экспрессии или стабильности токсинов и их растворимости, например инсерция
50 сильного экспрессирующего промотора или слияния токсина с сигналом секреции.

Другие авторы получают также исследованные генетические слияния токсинов с гетерологичными антигенами в живых вакцинах. В данных случаях токсин в

основном используют в качестве адъюванта. В ряде случаев (например, см. статью Brassier et al., 2000) гетерологичный антиген действует как адъювант, а токсин как подходящий антиген.

Однако важно отметить, что в упомянутых случаях экспрессия конструкции слитых генов токсина-антигена происходит исключительно цитоплазматически или периплазматически. Конструкция токсин-антиген не слита с дополнительным сигналом секреции (который может привести к его полной секреции) и не секретируется непосредственно.

В процессе получения данных конструкций слитых генов токсина-антигена используют рекомбинантную *E. coli* (см. статью Clemens et al., 2004), *Bacillus anthracis* (см. статью Brassier et al., 2000), *Shigella* (см. статьи Koprowski et al., 2000; Ranallo et al., 2005; Zheng et al., 2005) и штаммы *Vibrio* (см. статью Silva et al., 2003).

Для *Salmonella* (см. обзор в статье (Garmory et al., 2002)) описаны также слияния вариантов СТ с антигенами (см. статьи Hajishengallis et al., 1996; Huang et al., 2000) или других токсинов с антигенами (см. статьи Barry et al., 1996; Cardenas и Clements, 1993; Chabalgoity et al., 1997; Chabalgoity et al., 1996; Chabalgoity et al., 2000; Chabalgoity et al., 1995; Chacon et al., 1996; Jagusztyn-Krynicka et al., 1993; Khan et al., 1994a; Khan et al., 1994b; Lee et al., 2000; Pogonka et al., 2003; Schodel et al., 1990; Smerdou et al., 1996; Ward et al., 1999; Wu et al., 2000).

В большинстве данных случаев основное внимание сосредоточено на индукции иммунного ответа слизистых (антител), и для индукции системного иммунного ответа выбирают только подкожное, но не пероральное применение [36].

Несколько работ с *Salmonella* в качестве поддерживающего штамма ограничены простой характеристикой штамма (см. статьи Gomez-Duarte et al., 1995; Jagusztyn-Krynicka et al., 1993), в других только анализируют ответ антител слизистых и/или системный ответ антител и/или защиту (см. статьи Barry et al., 1996; Cardenas и Clements, 1993; Dunstan et al., 2003; Hajishengallis et al., 1996; Harokopakis et al., 1997; Khan et al., 1994a; Khan et al., 1994b; Pogonka et al., 2003; Smerdou et al., 1996; Somner et al., 1999). Во всех данных случаях, где попутно используют слияние антигена и столбнячного токсина и которые используют исключительно в качестве противоифекционных вакцин, системные клеточные иммунные ответы, особенно ответы цитотоксических Т-клеток, не изучали.

Вследствие этого, с иммунологической точки зрения из данных исследований нельзя сделать никаких заключений относительно потенциального применения в качестве противоопухолевой вакцины, поскольку они сосредоточены на опосредованных антителами эффектах в качестве противоифекционных вакцин.

Исследования, которые включают анализ изотипа исследуемого иммунного ответа, по-видимому, являются более подходящими. В действительности в данных случаях непосредственно измеряют клеточные иммунные ответы, но изотипический профиль ответа антител позволяет сделать заключение относительно сдвига Th1/Th2 иммунного ответа. Изотипы антител, подобных IgG1, связаны с ответами Th2, и изотипы, подобные IgG2a, ассоциированы с ответами ТМ. Как уже отмечали, ответы ТМ представляют собой преобладающие клеточные иммунные ответы, тогда как ответы Th2 в основном представляют гуморальные ответы, направляемые антителами. Кроме того, в данных исследованиях не описывают противоопухолевые вакцины, и в них не предполагают какого-либо применения противоопухолевого агента.

Одно исследование противоифекционной вакцины на основе *Salmonella* в

качестве носителя, которая экспрессирует слитый белок столбнячного токсина и антигена, осуществлено на собаках. Низкие уровни ответов антител, которые индуцированы у собак, показывают сдвиг ТМ, касающийся профиля антител, следовательно, ответа, который сильно коррелирует с иммунным ответом

5 клеточного типа (см. статью Chabalgoity et al., 2000). Надо отметить, что иммунология собак недостаточно изучена и, вследствие этого, неясно, в какой степени профиль антител собаки может дать информацию относительно сдвига Th1.

Исследования на мышах, проведенные той же группой с использованием

10 сравнимых конструкций, показали тем не менее профиль антител с одинаковым уровнем для IgG1, что для IgG2a, что будет указывать на смешанный ответ Th1/Th2.

Интересно, что имеющийся иммунитет к столбнячному токсину, который обнаружен у большинства людей вследствие предшествующих иммунизации, вызывает иную относительно сильную индукцию IgG1, тогда как IgG2a почти не

15 индуцируется. Это ясно указывает на другое соотношение Th2 (см. статью Chabalgoity et al., 1995). По данной причине живая вакцина на основе столбнячного токсина в качестве противоопухолевой вакцины является очень вредной для использования на человеке. Вследствие этого можно ожидать, что сильный вызываемый антителами

20 ответ Th2 индуцируется у большинства данных пациентов, которые демонстрируют специфический ответ на столбнячный токсин.

Только в некоторых исследованиях также анализируют клеточный иммунный ответ и сравнивают генетические конструкции со слитым токсином и без него. В

25 одном случае, например, слияние антигена со столбнячным токсином и без него сравнивают на *Salmonella* (см. статью Lee et al.). В данном случае слитая конструкция столбнячного токсина и антигена главным образом повышает общий уровень антител, тогда как профиль Th1/Th2 мало изменяется. Даже антиген-специфическая секреция Т-клетками CD4+ типичных цитокинов Th1, таких как ИФН- γ и ИЛ-2

30 соответственно, показывает только слабое отклонение. В более раннем исследовании той же группы измеряют также уровни ИФН- γ . Однако не представлено никакого сравнения с конструкциями без столбнячного токсина (см. статью Chabalgoity et al.). В других исследованиях с различными

35 грамположительными бактериальными носителями, подобными *Shigella* (см. статьи Koprowski et al., Ranallo et al., Zheng et al.) или *Vibrio* (см. статьи Campos et al., Ryan et al.), не анализируют ни изоотипы, ни клеточные иммунные ответы. Подводя итоги, можно утверждать, что упомянутые исследования ясно сосредоточены на индукции направляемого антителами гуморального иммунного ответа. В

40 действительности используют генетические конструкции токсина и антигена, но они не имеют сигнала секреции и они непосредственно не секретируются. Однако ни при каких условиях не анализировали системные клеточные иммунные ответы, в частности ответы цитотоксических Т-клеток. К тому же данные клеточные ответы цитотоксических Т-клеток не могут быть выведены из гуморального ответа антител

45 и не могут быть определены, если ответ антител включает Th1/Th2.

Однако, это именно те клеточные иммунные ответы цитотоксических Т-клеток, которые важны для использования в лечении путем противоопухолевой вакцинации.

Тем не менее, в плане слияний токсин-антиген, которые ограничены только

50 противоинфекционными вакцинами для слизистых, состояние уровня техники не допускает никакого утверждения относительно возможного использования каких-либо данных конструкций в качестве противоопухолевых вакцин.

Как уже отмечено, экспрессию генетических слитых конструкций осуществляют

без помощи системы секреции. Токсины и конструкции токсин-антиген, соответственно, как правило, расположены цитоплазматически, а также периплазматически, т.е. между двумя мембранами. Для индукции эффективного клеточного иммунного ответа токсин должен быть свободно доступен для антиген-презентирующей клетки (АРС). Как правило, нативный токсин продуцируется в периплазме грамотрицательных бактерий. Это достаточно для полных иммунных ответов слизистых, поскольку периплазматические токсины могут выйти из периплазмы в толстой кишке и, следовательно, также являются доступными (см. статью Hunt и Hardy, 1991). Однако это не принимают во внимание, если носитель направлен на антигенпрезентирующие клетки вне толстой кишки, такие как, например, пейеровы бляшки или лимфатические органы, такие как лимфатические узлы или селезенка.

В принципе, два фактора являются важными в плане эффективности противоопухолевой вакцины: индукция клеточного иммунного ответа Th1-типа и участие компонентов врожденной иммунной системы, таких как NK-клетки, NKT-клетки и γ - δ Т-клетки, которые играют важную роль в плане эффективности противоопухолевой терапии (см. статью Dunn et al., 2004).

Важность данных компонентов врожденных иммунных систем лежит на множестве уровней. Должным образом активированные NK- и γ - δ Т-клетки способны локально продуцировать большие количества ИФН- γ . Данный интерферон, который также продуцируется специфическими Th1-поляризованными Т-клетками, имеет множество функций, относящихся к терапии опухолей. Одной из его главных функций является ингибирование ангиогенеза, которое перекрывает снабжение опухоли кислородом и питательными веществами и приводит фактически к голоданию опухоли. Кроме того, NK-клетки имеют рецепторы, которые распознают молекулы МНС класса I. Если данные молекулы присутствуют на клетке, NK-клетки ингибируются.

Что касается вакцины, которая индуцирует специфические цитотоксические Т-клетки, то опухолевые клетки могут быть уничтожены данными CTL. Если опухолевая клетка теряет свою способность экспрессировать молекулы МНС класса I, что очень часто имеет место в опухолях, специфические цитотоксические Т-клетки неэффективны. Вследствие этого в данном случае ингибирование NK-клеток прекращается, и они способны непосредственно элиминировать опухолевые клетки.

Следовательно было бы идеальным, если бы противоопухолевая вакцина эффективно индуцировала оба компонента. Имеются противоречивые данные относительно сдвига Th1-Th2 слитого токсина-адъюванта. Как обсуждалось ранее, слитые конструкции токсин-антиген, используемые в выделенном виде, очевидным образом индуцируют сильный Th2-поляризованный иммунный ответ. Ряд авторов, кроме того, описывает низкий уровень сдвига для живых носителей; другие авторы отмечают небольшой Th1-сдвиг.

Однако данные результаты снова основаны исключительно на несекретируемых конструкциях. Индукцию врожденного иммунитета с помощью данных типов противоиных вакцин никогда не сравнивали и не предусматривали.

Как уже отмечено, главная причина состоит в том, что имеющиеся вакцины представляют собой противоиных вакцины для слизистых, а не противоопухолевые вакцины. Вследствие этого индукция Th1-иммунных ответов, иммунных ответов CTL и ответов врожденной иммунной системы не были в центре внимания. Напротив, что касается противоопухолевых вакцин, индукция данных

иммунных ответов обязательна.

Интересно, что в биологии клетки нативные токсины обычно используют как ингибиторы путей передачи сигнала. Так, среди прочего показано, что нативный токсин коклюша, но не холерный токсин, способен ингибировать определенный тип апоптоза NK-клеток (см. статью Ramirez et al., 1994). Другое научное исследование способно показать, что холерный токсин, но не его В-субъединица, блокирует специфические функции NK-клеток (см. статью Poggi et al., 1996). Нативный токсин коклюша используют для ингибирования хемотаксиса лимфоцитов (см. статью Spangrude et al., 1985). Даже если данные исследования не относятся к противоопухолевой вакцинации, компетентный специалист в области техники мог бы сделать заключение о том, что использование токсинов в качестве противоопухолевых вакцин было бы вредным, поскольку ответ врожденной иммунной системы, важный для терапии опухолей, более ингибируется, чем индуцируется.

Другие научные исследования способны показать, что токсины, подобные нативному токсину коклюша (не инактивированному токсину коклюша), эффективно индуцируют компоненты врожденной иммунной системы. Касательно иммунотерапии опухолей это будет означать, что если их вообще будут использовать, то следует использовать нативные токсины. Однако по причинам токсичности данный тип введения недопустим. Кроме того, данная индукция неизбежно приводила бы к Th2-направляемому вторичному иммунному ответу, который в свою очередь будет вредным для лечения опухолей (см. статью Boyd et al., 2005). Следовательно, касательно индукции врожденного иммунного ответа, в предшествующем уровне техники не описана и не предусмотрена противоопухолевая вакцинация. Напротив, критический анализ литературы даже мешает использованию токсинов при лечении опухолей.

Интересным, тем не менее, является анализ синергического эффекта токсинов или их субъединиц с другими стимуляторами, такими как иммуностимулирующие олигонуклеотиды ДНК с гипометилированными мотивами CpG (CpG ODN) (см. статью Holmgren et al., 2005) или липосахариды (LPS). В случае LPS в основном индукция моноцитов, по-видимому, повышается главным образом посредством В-субъединицы токсинов, тогда как она ингибируется токсином в целом (голотоксином) (см. статью Hajishengallis et al., 2004). Однако данные исследования основаны исключительно на использовании очищенных слитых конструкций токсин-антиген, к которым добавляют субстанции, подобные LPS или CpG в качестве адъювантов. Кроме того, анализ в данном случае проводят только на макрофагах, которые индуцируют адаптивный иммунный ответ, но непосредственно не действуют на опухоли. Следовательно, данные исследования не имеют существенного значения касательно индукции компонентов врожденной иммунной системы, в частности, NK-клеток, которые могут непосредственно действовать на опухоли.

Другие исследования, однако, показывают, что NK-клетки могут быть активированы и хемотаксически привлечены токсинами, подобными экзотоксину A *Pseudomonas aeruginosa* (см. статью Muhlen et al., 2004). В зависимости от экспериментальной системы можно также индуцировать Th1-ответы, хотя вследствие этого главным образом происходит супрессия NK-клеток и Th1-ответов (см. статью Michalkiewicz et al., 1999). Тем не менее, данные исследования в основном направлены на анализ гепатотоксичности энтеротоксина A и не относятся к

противоопухолевой вакцинации. Интересно, что эффекты являются в высокой степени дозозависимыми, и только незначительное изменение дозы может инвертировать эффекты. Хотя авторы не могли показать, какой ответ эффективно имеет место *in vivo*. Вследствие этого данные не дают предсказания, какие эффекты могут иметь место, если токсин или даже детоксифицированный токсин используют в качестве адъюванта.

В общем и целом иммунный ответ в сильной степени зависит от используемой конкретной системы. В большинстве случаев противоиnфекционная вакцина для слизистых направлена на локальную манипуляцию с иммунной системой в слизистой с целью индукции эффективного иммунного ответа в слизистых (см. статью Луске, 2005). Однако данные исследования не включают разработку противоопухолевой вакцины. Кроме того, в данных исследованиях отсутствует информация об индукции системных клеточных иммунных ответов, в частности ответов цитотоксических Т-клеток, которые являются основными для противоопухолевой вакцинации.

Уже показано, что секреция гетерологичного антигена дает преимущества системному иммунному ответу (см. статью Hess et al., 1996). Однако описанные секретируемые антигены не являются секретируемыми конструкциями токсин-антиген; токсины или их субъединицы не используют. Достижимые таким образом иммунные ответы в модели трансгенной опухоли также в высокой степени ограничены (см. статью Gentschev et al., 2005). Действительно, в данном случае могут быть индуцированы слабые ответы антител и цитотоксических Т-клеток, которые частично защищают от развития опухоли. Однако, не только сами иммунные ответы, но и сама защита ограничена. Аналогично в данных исследованиях противоопухолевой вакцинации отсутствует сравнение с несекретируемыми конструкциями. Более того, сравнительные исследования не проводили в контексте противоопухолевой вакцинации (см. статью Hess et al., 1996) и, они противоречат дальнейшим исследованиям, в которых не наблюдают какого-либо преимущества в отношении секреции (см. статьи Garmory et al., 2002; Roland et al., 2005). В итоге и как отмечено ранее, предшествующий уровень техники очень противоречив в плане секреции и в общем и целом не дает никакого намека касательно потенциальных преимуществ секретируемых конструкций токсин-антиген при лечении опухолей. Напротив, критический анализ имеющейся литературы в значительной мере противоречит данному типу применения.

Бактериальные токсины (см. статью Todar, 2002): на химическом уровне существует два типа бактериальных токсинов, липополисахариды, которые связаны с клеточными стенками грамотрицательных бактерий, и белки, которые высвобождаются из бактериальных стенок и могут действовать на тканевые участки, удаленные от области бактериального роста. Связанные с клеткой липополисахаридные (LPS) токсины называют эндотоксинами, и внеклеточные способные к диффузии токсины называют экзотоксинами.

Экзотоксины, как правило, представляют собой растворимые белки, секретируемые живыми бактериями в период экспоненциального роста, но в ряде случаев они высвобождаются путем лизиса бактериальной клетки. Продукция токсина, как правило, специфична в отношении определенных видов бактерий, которые вызывают заболевание, ассоциированное с токсином (например, только *Clostridium tetani* продуцирует столбнячный токсин; только *Corynebacterium diphtheriae* продуцирует дифтерийный токсин). Как грамположительные, так и грамотрицательные бактерии продуцируют растворимые белковые токсины.

В общем имеется три класса белковых (экзо)токсинов: (i) токсины типа I (суперантигены), которые связываются с поверхностью клетки-хозяина и модулируют иммунный ответ, но не транслоцируются в клетку, (ii) токсины типа II (порообразующие токсины), которые действуют на мембрану клетки-хозяина и вызывают вытекание из клетки-хозяина и ее гибель, и (iii) токсины типа III (А-В токсины), которые связываются с клеткой-хозяином посредством специфического рецептора и транслоцируются в клетку, становятся в ней активными и модифицируют белки или другие компоненты клетки-хозяина.

Как показано выше, токсины типа III, действующие внутриклеточно в отношении клеток-хозяев, состоят из двух компонентов: один компонент (субъединица А) отвечает за ферментную активность токсина, другой компонент (субъединица В) участвует в связывании со специфическим рецептором на мембране клетки-хозяина и переносе фермента через мембрану. Ферментный компонент неактивен до тех пор, пока не высвободится из нативного (А+В) токсина. Выделенные А-субъединицы ферментативно активны, но лишены способности связывания и входа в клетку. Выделенные В-субъединицы могут связываться с клетками-мишенями (и даже блокировать связывание нативного токсина), но они нетоксичны.

Существует ряд путей, которыми можно синтезировать и собрать субъединицы токсина: А+В показывает, что токсин синтезирован и секретируется в виде двух отдельных белковых субъединиц, которые взаимодействуют на поверхности клетки-мишени; А-В или А-5В или АВ5 показывает, что А- и В-субъединицы синтезируются раздельно, но связаны нековалентными связями во время секреции и связываются со своей мишенью; 5В или В5 показывает, что домен связывания белка состоит из 5 идентичных субъединиц. АВ или А/В показывает токсин, синтезированный в виде одного полипептида, разделенного на домены А и В, которые могут быть разделены путем протеолитического расщепления. Примерами токсинов АВ или А/В являются дифтерийный токсин, экзотоксин А, ботулинический токсин и столбнячный токсин. Примерами токсинов А-5В или АВ5 являются холерный токсин и шига-токсин, тогда как токсин сибирской язвы LF и токсин сибирской язвы EF являются примерами токсинов А-В.

Дальнейшие имеющие отношение к делу документы предшествующего уровня техники включают следующие:

Michl et al. описывают использование бактерий и бактериальных токсинов в качестве лечебных факторов для солидных опухолей. Раскрывают слитые конструкции токсин-антиген, а также бактериальную направленность данной конструкции. Исследуют использование дифтерийного токсина (DT), экзотоксина А *Pseudomonas* (PE) и энтеротоксина *Clostridium perfringens* (CPE). Однако авторы не упоминают использование холерного токсина и не показывают или не представляют заметную секрецию слитых конструкций токсин-антиген, выделенных из бактерий (см. статью Michl и Gress, 2004).

Lahiri представляет обзор по различным бактериальным токсинам и обсуждает их разнообразное применение. Хотя автор упоминает слитые белки токсин-антиген, он не говорит о холерном токсине и бактериальной направленности секретируемых слитых конструкций токсин-антиген (см. статью Lahiri, 2000).

Lavelle et al. раскрывает молекулы инфекционных агентов в качестве иммуномодулирующих лекарственных препаратов. Авторы также отмечают слитые белки холерного токсин-антигена, поданные конструкции используют только непосредственно как белки и не в качестве генетически модифицированных живых

вакцин (см. статью Lavelle et al., 2004).

Заявка WO 01/74383 направлена на химерные иммуногены для слизистых типа антиген-энтеротоксин и, кроме того, в ней упоминают использование субъединиц холерного токсина A2 и В. Однако, данные химерные иммуногены всегда включают субъединицы A2 и В одновременно и предназначены для использования в иммунизации через слизистые, но не в лечении опухолей.

Заявка WO 02/077249 описывает авирулентные мутантные штаммы *Yersinia enterocolitica*, предназначенные для доставки гетерологичных белков к специфическим мутантным клеткам-мишеням. Кроме того, упоминают использование субъединицы A1 холерного токсина, но патентный документ не говорит о секреции и относится только к лечению инфекций и инфекционных состояний.

Заявка WO 2004/018630 раскрывает рекомбинантные двухцепочечные РНК-фаги, кодирующие двухцепочечную эукариотическую экспрессирующую кассету. Хотя упоминают субъединицу А холерного токсина, документ не имеет дальнейшей значимости. Holmgren et al. дают краткий обзор, касающийся области иммунизации слизистых и адъювантов. Авторы обсуждают в числе прочего эффекты холерного токсина как адъювантов для слизистых, но не раскрывают информацию о генетических экспрессирующих системах или живых вакцинах и, кроме того, не говорят о противоопухолевой терапии (см. статью Holmgren et al., 2003).

Holmgren и Czerkinsky приводят также обзор по иммунитету слизистых и вакцинам. Однако данная статья ограничена только противoinфекционными факторами и в ней не обсуждают или не представляют очевидное возможное применение в области противоопухолевой терапии (см. статью Holmgren и Czerkinsky, 2005).

В другом обзоре, написанном Freytag и Clements, обсуждают адъюванты для слизистых в плане применения в противoinфекционной иммунотерапии. Хотя холерный токсин отмечают в качестве адъювантов для слизистых, авторы не говорят о секретируемых конструкциях токсин-антиген и противоопухолевой терапии как возможной области применения (см. статью Freytag и Clements, 2005).

Shaw и Starnbach описывают использование модифицированных бактериальных токсинов для доставки вакцинных антигенов. Однако в статье не упоминают холерный токсин и, кроме того, ограничиваются прямым применением слитых белков токсин-антиген для целей вакцинации (см. статью Shaw и Starnbach, 2003).

Заявка WO 03/072789 направлена на микроорганизмы как носители нуклеотидных последовательностей, кодирующих клеточные антигены, используемые для лечения опухолей. Хотя патентный документ упоминает секрецию и использование в области противоопухолевой терапии, он совсем не говорит о бактериальных токсинах и слитых белках. В работах Gentshev, Dietrich и Goebel, а также Gentshev et al. описывают бактериальную направленность и ее использование в разработке противоопухолевой вакцины. Однако в двух данных документах не упоминают о применении бактериальных токсинов и слитых белков в противоопухолевой терапии (см. статьи Gentshev et al., 2002a; Gentshev et al., 2002b).

Заявка WO 98/23763 раскрывает клетки *Vibrio cholerae*, экспрессирующие субъединицы В и D гемолизина *E. coli* наряду со слитым полипептидом, который включает гетерологичный антиген, слитый с hylA. Далее описан вакцинный штамм *Vibrio cholerae*, который экспрессирует субъединицу В холерного токсина и слитый полипептид секреторной сигнальной последовательности, гетерологичного антигена и субъединицы A2 холерного токсина. Наконец, описан слитый полипептид,

который включает субъединицу В холерного токсина, слитую с антигенной частью субъединицы А или В токсина *C.difficile*. Однако в патентной заявке не упоминают использование слитого белка белкового токсина с антигеном гетерологичного небелкового токсина в противоопухолевой терапии.

5 Dietrich с соавт. обсуждают два инструмента для доставки вакцины - гемолизин А и Ns-териолизин, которые можно использовать для получения опосредованного клетками иммунитета. Однако не упоминают никаких слитых белков типа белковый токсин - гетерологичный антиген или совместной экспрессии (см. статью Dietrich et al., 2003).

10 Gentshev et al. описывают использование системы секреции α -гемолизина *Escherichia coli* для доставки антигена в вакцинном штамме *Salmonella typhi* Ty21. Однако авторы не упоминают об использовании бактериальных токсинов и слитых белков в противоопухолевой терапии (см. статью Gentshev et al., 15 2004).

Заявка WO 02/47727 направлена на лечебные факторы, включающие В-субъединицу белкового токсина. Документ раскрывает только слитые белки CtxB и EtxB с вирусным антигеном. Не упоминают никакую бактериальную вакцину или 20 доставку бактериальной вакцины.

Cheng-hua S и соавт. описывают слияние генов В-субъединицы холерного токсина и эпитопа HBV PreS2 и антигенность слитого белка в исследованиях прямой иммунизации. Однако не упоминают никакую бактериальную вакцину или доставку 25 бактериальной вакцины (см. статью Cheng-hua et al., 1995).

30 Sanchez et al. раскрывают, что ген В-субъединицы холерного токсина повышает цитотоксические ответы иммуноглобулина А, Th1-типа и CD⁸⁺ при внутрикожном совместном введении с ДНК-вакциной (см. статью Sanchez et al., 2004). Однако в данном подходе авторы используют ДНК в качестве носителя, который действует как стимулирующий Th1 адъювант для самой себя. Кроме того, белки продуцируются клетками-хозяевами и не доставляются непосредственно или с 35 помощью бактериального носителя и, вследствие этого, непосредственно доступны для эукариотических клеток.

Заявка WO 01/29233 направлена на химерные иммуногенные композиции и кодирующие их нуклеиновые кислоты. Однако не упоминают никакую 40 бактериальную вакцину или доставку бактериальной вакцины.

Заявка WO 2007/044406 относится к способам стимуляции иммунного ответа с использованием системы доставки бактериального антигена, которая основана на SopE, несущем сигнал секреции типа III. Однако в патентной заявке не упоминают 45 использование бактериальных токсинов и слитых белков в противоопухолевой терапии.

В итоге, из предшествующего уровня техники можно заключить, что невозможно 50 создать нативные токсины для использования у человека вследствие их сильной токсичности. Кроме того, их использование в противоопухолевой терапии было бы вредным, поскольку подавлялся бы ответ врожденной иммунной системы, в частности NK-клеток. Однако, это тот иммунный ответ, который является важным компонентом успешной противоопухолевой терапии, поскольку опухолевые клетки очень часто утрачивают свою способность экспрессировать молекулы МНС класса I и вследствие этого устойчивы к распознаванию и атаке CTL.

Использование субъединиц детоксифицированного токсина, с другой стороны, отдельно или слитых с (гетерологичными) белками антигенов приводит в результате

к сильно аттенюированному адьювантному эффекту и/или даже индуцированной системной толерантности иммунной системы, а также ограниченными слизистыми иммунными ответами антител и Th2-типа.

Кроме того, секрция слитых белков (гетерологичный) антиген-токсин, которая описана только в разделе противинфекционных вакцин (т.е. затрагивает антиген или даже сам токсин), как считают, не только не проявляет преимуществ относительно цитоплазматической экспрессии, но, в общем, скорее является неприемлемой. В общем и в целом не представлен ни подход противоопухолевой терапии, ни системная индукция Th1-преобладающего клеточного иммунного ответа с использованием Т-клеток-хелперов, продуцирующих ИФН- γ , ни индукция CTL, и не описана или не достигнута активация врожденной иммунной системы, все аспекты, которые необходимы для противоопухолевой терапии.

Раскрытие изобретения

Целью настоящего изобретения является получение новых противоопухолевых вакцин, посредством которых индуцируют сильный системный клеточный ответ иммунной системы и может быть достигнута эффективная противоопухолевая терапия.

Цель настоящего изобретения неожиданно осуществлена в одном аспекте путем получения микроорганизма в качестве носителя нуклеотидных последовательностей, кодирующих антигены и белковые токсины, включающего следующие компоненты:

первый компонент (I) в виде по меньшей мере одной нуклеотидной последовательности, кодирующей по меньшей мере один полный или неполный антиген из по меньшей мере одного белка дикого типа или мутантного белка,

второй компонент (II) в виде по меньшей мере одной нуклеотидной последовательности, кодирующей по меньшей мере один белковый токсин и/или по меньшей мере одну субъединицу белкового токсина,

третий компонент (III), состоящий по меньшей мере из одного первого подкомпонента (III-а) в виде по меньшей мере одной нуклеотидной последовательности, кодирующей по меньшей мере одну систему транспорта, которая обеспечивает возможность экспрессии продуктов экспрессии компонента (I) и компонента (II) на наружной поверхности микроорганизма и/или обеспечивает возможность секретиции продуктов экспрессии компонента (I) и компонента (II) и/или кодирующую по меньшей мере одну сигнальную последовательность, которая обеспечивает возможность секретиции продуктов экспрессии компонента (I) и компонента (II) и/или, необязательно,

второго подкомпонента (III-б) в виде по меньшей мере одной нуклеотидной последовательности, кодирующей по меньшей мере один белок для лизиса микроорганизма в цитозоле клеток млекопитающих и для внутриклеточного высвобождения плазмид или векторов экспрессии, которые содержатся в лизированном микроорганизме, и

и четвертый компонент (IV) в виде по меньшей мере одной нуклеотидной последовательности для по меньшей мере одной последовательности активации для экспрессии по меньшей мере одного компонента (I)-(III), причем указанная последовательность активации может быть активирована в микроорганизме и/или является специфической для клетки ткани, специфической для опухолевой клетки, макрофаг-специфической, дендрит-специфической, лимфоцит-специфической, функция-специфической или неспецифической в отношении клетки.

Вышеперечисленные любые из компонентов (I)-(IV) могут присутствовать либо

один, либо несколько раз и, если какой-либо из компонентов (I)-(IV) присутствует несколько раз, он может независимо друг от друга быть либо идентичным, либо отличающимся.

В предпочтительном варианте осуществления предусматривают микроорганизм, включающий вышеописанные компоненты (I)-(IV), причем компонент (I) и компонент (II) неидентичны, т.е. компонент (I) не кодирует по меньшей мере одну нуклеотидную последовательность, кодирующую по меньшей мере один белковый токсин и/или по меньшей мере одну субъединицу белкового токсина.

Термин "специфический в отношении клетки ткани" в сочетании с компонентом (IV) на протяжении настоящего изобретения относится к последовательности(ям) активации, которая специфически активирована в клетках ткани-мишени, таких как, например, гормон-зависимые промоторы в тканях простаты.

Термин "специфический в отношении опухолевых клеток" в сочетании с компонентом (IV) на протяжении настоящего изобретения относится к последовательности(ям) активации, которая специфически активирована в опухолевых клетках, таких как промоторные элементы, активированные действием опухолеспецифических онкогенов.

Термин "макрофаг-специфический" в сочетании с компонентом (IV) на протяжении настоящего изобретения относится к последовательности(ям) активации, которая специфически активирована в макрофагах, таких как промоторные элементы, которые кодируются макрофаг-специфическими генами, например, геном, кодирующим F4/80.

Термин "дендрит-специфический" в сочетании с компонентом (IV) на протяжении настоящего изобретения относится к последовательности(ям) активации, которая специфически активирована в дендритных клетках, таких как промоторные элементы, контролирующие экспрессию B7.1. Термины "дендрит-специфический" и "специфический в отношении дендритных клеток" эквиваленты, т.е. они имеют одинаковое значение и оба относятся к дендритным клеткам.

Термин "лимфоцит-специфический" в сочетании с компонентом (IV) на протяжении настоящего изобретения относится к элементам, которые специфически активированы в клетках лимфоцитарной линии, таким как промоторные элементы, регулирующие экспрессию молекул CD3 в Т-клетках, или промоторные элементы, регулирующие экспрессию CD20 в зрелых В-клетках.

Термин "функция-специфический" в сочетании с компонентом (IV) на протяжении настоящего изобретения относится к последовательности(ям) активации, которая специфически активирована в клеточном контексте, например, в опухолевых клетках, которые утратили экспрессию p53, или последовательности(ям) активации, которая активирована в бактериях в зависимости от контекста, например клеточной локализации или давления кислорода.

Термин "неспецифический в отношении клетки" в сочетании с компонентом (IV) на протяжении настоящего изобретения относится к последовательности(ям) активации, которая повсеместно активна, таким как конститутивно активные бактериальные промоторы.

Термин "нуклеотидная последовательность" на протяжении настоящего изобретения относится к dsDNA, ssDNA, dsRNA, ssRNA или гибридам dsDNA/RNA. Предпочтительной является dsDNA.

Термин "антиген" на протяжении настоящего изобретения относится к молекулам,

которые взаимодействуют с антителами, т.е. которые способны генерировать антитела. Некоторые антигены сами по себе не вызывают продукцию антител; только те, которые могут индуцировать продукцию антител, называют иммуногенами. Для цели настоящего изобретения предусматривают включение всех известных антигенов. В уровень знаний компетентного специалиста в области техники входит найти необходимую информацию относительно потенциальных антигенов с помощью баз данных и/или экспериментального скрининга без излишних усилий. Примерами антигенов являются в числе прочих клеточных антигенов специфические антигены клеток ткани (например, клеток ткани, из которых происходит опухоль), клеточные белковые антигены, вирусные антигены, вирусные белковые антигены и т.п. Предпочтительными являются белковые антигены. Кроме того, предпочтительны гетерологичные антигены или чужеродные антигены, т.е. антигены, которые не являются эндогенными для соответствующего микроорганизма, представленного в изобретении, или антигены, которые не экспрессируются соответствующим микроорганизмом, представленным в изобретении, в естественных условиях, но интродуцированы с помощью стандартных молекулярных биотехнологических способов.

Термин "полный антиген" на протяжении настоящего изобретения относится к полным молекулам, которые реагируют с антителами согласно вышеприведенному определению. Примерами полных антигенов являются, например, белки полной длины (непроцессированные), которые также предпочтительны.

Термин "неполный антиген" на протяжении настоящего изобретения относится к специфическим частям молекул, которые реагируют с антителами согласно вышеприведенному определению. Частичные антигены могут представлять собой, например, белковые мотивы, такие как аминокислотные петли в белках, домены протеинкиназы, эпитопы и т.п. Предпочтительными являются домены протеинкиназы и эпитопы, последние из которых представляют собой специфические центры антигена, распознаваемого антителом (называемые также антигенными детерминантами).

Термины "дикий тип" и "мутантный" в сочетании с термином "белок" на протяжении настоящего изобретения относятся к белкам, состоящим из их любой "природной" преобладающей последовательности аминокислот (кодируемой соответствующей нуклеотидной последовательностью), и белкам, которые включают одну или более мутаций в их последовательностях аминокислот (кодируемых соответствующей нуклеотидной последовательностью) по сравнению с последовательностью дикого типа соответственно. Предпочтительно, когда белки дикого типа и/или мутантные белки выделены из опухолевых клеток. Что касается неполных антигенов, предпочтительно, кроме того, чтобы последовательность охватывала мутации, т.е. выбирают эпитоп, который предпочтительно включает одну или более мутаций, например, эпитоп B-Raf V600E.

Микроорганизмы в понимании изобретения представляют собой бактерии, грамположительные бактерии, грамотрицательные бактерии и эукариотические клетки, из которых последние включают одноклеточные паразиты, дрожжи, опухолевые клетки и клетки клеточных линий, такие как *Sacharomyces cerevisiae*, *Leishmania* spp., аутологичные выделенные у пациента опухолевые клетки и опухолевые клеточные линии. Данные микроорганизмы, как правило, используют в качестве носителей для переноса нуклеотидных последовательностей, являющихся чужеродными (гетерологичными или гетерогенными) для микроорганизма.

Предпочтительно, когда используют бактерии, которые аттенюированы по вирулентности, например бактерии, которые несут делецию или инактивированный ген *aroA*, *aro*, *asd*, *gal*, *pur*, *сya*, *сrр*, *rhoP/Q*, *omp* или представляют собой температурочувствительные мутанты (см. статью Cardenas и Clements, 1992). Кроме того, предпочтительной в качестве микроорганизма, включающего вышеуказанные компоненты (I)-(IV), является грамотрицательная, аттенюированная, факультативно внутриклеточная бактерия в качестве носителя, который способен преодолевать слизистую оболочку кишки (например, *Salmonella* spp. или *Shigella* spp.).

В предпочтительном варианте осуществления предусматривают микроорганизм, включающий вышеуказанные компоненты (I)-(IV), причем микроорганизм выбран из группы, состоящей из "бактерии, грамположительной бактерии, грамотрицательной бактерии, эукариотической клетки" и предпочтительно выбран из группы, состоящей из "*Escherichia* spp., *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Salmonella typhi*, *Salmonella typhimurium*, *Yersinia* spp., *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio* spp., *Vibrio cholerae*, *Listeria* spp., *Listeria monocytogenes*, *Shigella* spp., *Shigella flexneri*", причем предпочтительно, когда вирулентность микроорганизма аттенюирована. Кроме того, предпочтительный *Vibrio cholerae* исключен из определенных выше микроорганизмов.

Термин "spp." в связи с любым микроорганизмом предусматривает включение для цели настоящего изобретения всех членов данного рода, включая виды, подвиды и др. Термин "*Salmonella* spp.", например, предусматривает включение всех членов рода *Salmonella*, таких как *Salmonella typhi* и *Salmonella typhimurium*.

В другом предпочтительном варианте осуществления предусматривают микроорганизм, соответствующий вышеприведенным определениям, в котором по меньшей мере один полный или неполный антиген по меньшей мере одного белка дикого типа или мутантного белка, соответствующий компоненту (I), выбран из группы, состоящей из следующих белков дикого типа и их известных мутантов: "рецептор; внеклеточная, трансмембранная или внутриклеточная часть рецептора; молекула адгезии; внеклеточная, трансмембранная или внутриклеточная часть молекулы адгезии; белок сигнальной трансдукции; белок клеточного цикла; фактор транскрипции; белок дифференцировки; эмбриональный белок; вирусный белок; аллерген; белок микробного патогена; белок эукариотического патогена; белок антигена рака яичка; белок опухолевого антигена и/или специфический белок клетки ткани", причем клетка ткани выбрана из группы, состоящей из "щитовидной железы, молочной железы, слюнной железы, лимфатического узла, слизистой оболочки желудка, почки, яичника, простаты, шейки матки, серозной оболочки мочевого пузыря и невуза".

Что касается мутантного белка, то мутация может быть онкогенной и может быть вызывать утрату или расширение его исходных клеточных функций.

Данные антигены осуществляют в клетке контроль клеточного роста и деления клетки и представлены на клеточной мембране нормальных клеток, например, посредством молекулы МНС класса I. В опухолевых клетках данные гены часто сверхэкспрессируются или специфически мутируют. Данные мутации могут иметь ограничения функций супрессоров онкогенов или, как следствие, активации протоонкогенов в онкогены и могут быть включены сами по себе или, обыкновенно, со сверхэкспрессией в рост опухоли. Данные клеточные антигены представлены на мембране опухолевых клеток и, таким образом, представляют антигены на опухолевых клетках, однако, не вызывая иммунную реакцию, воздействующую на

опухолевое заболевание пациента. Rapp (US 5156841) уже описал использование онкопротеинов, т.е. продуктов экспрессии онкогенов в качестве иммуногена для противоопухолевых вакцин.

Примерами антигенов и их (онкогенных) мутаций, соответствующих изобретению, являются i) рецепторы, такие как Her-2/neu, андрогенный рецептор, эстрогенный рецептор, лактоферриновый рецептор, midkine-рецептор, рецептор EGF, рецептор ERBB2, ERBB4, рецептор TRAIL, FAS, рецептор TNF α , рецептор TGF- β ; ii) белки сигнальной трансдукции, такие как c-Raf (Raf-1), A-Raf, B-Raf, B-Raf V599E, B-Raf V600E, B-Raf KD, домен киназы B-Raf V600E, домен киназы KD B-Raf V600E, B-Raf V600E, домен киназы B-Raf, домен киназы KD B-Raf, Ras, Bcl-2, Bcl-X, Bcl-W, Bfl-1, Brag-1, Mcl-1, A1, Bax, BAD, Bak, Bcl-Xs, Bid, Bik, Hrk, Bcr/abl, Myb, C-Met, IAP1, IAO2, XIAP, ML-IAP LIVIN, сурвивин, APAF-1; iii) белки контроля клеточного цикла, такие как циклин D(1-3), циклин E, циклин A, циклин B, циклин H, Cdk-1, Cdk-2, Cdk-4, Cdk-6, Cdk-7, Cdc25C, p16, p15, p21, p27, p18, pRb, p107, p130, E2F(1-5), GAAD45, MDM2, PCNA, ARF, PTEN, APC, BRCA, p53 и гомологи; iv) факторы транскрипции, такие как C-Мус, NF κ B, c-Jun, ATF-2, Sp1; v) эмбриональные белки, такие как карциноэмбриональный антиген, α -фетопротеин, MAGE, MAGE-1, MAGE-3, NY-ESO-1, PSCA; vi) антигены дифференцировки, такие как MART, Gp100, тирозиназа, GRP, TCF-4, основной миелин, α -лактальбумин, GFAP, простатаспецифический антиген (PSA), фибриллярный кислый белок, тирозиназа, EGR-1, MUC1; vii) вирусные антигены, такие как следующие вирусы: ВИЧ, HPV, HCV, HPV, EBV, CMV, HSV, вируса гриппа, вируса гриппа типа А, вируса гриппа типа А (H5N1) и (H3N2), вируса гриппа типа В, вируса гриппа типа С; гемагглютининов, гемагглютинина H1, гемагглютинина H5, гемагглютинина H7, гемагглютинина HA1 (предпочтительно из вируса гриппа А (A/Thailand/1(KAN-1)2004(H5N1)), гемагглютинина HA12 (предпочтительно из вируса гриппа А (A/Thailand/1(KAN-1)2004(H5N1)), гемагглютинина HA12C (предпочтительно из вируса гриппа А (A/Thailand/1(KAN-1)2004(H5N1)), нейрамидаза, микробные антигены: р60, LLO, уреазы и т.п., антигены эукариотических патогенов: CSP (малярия), калфлагин (трипаносома), CPB (*Leishmania major*) и т.п.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления предусматривают микроорганизм, соответствующий вышеприведенным определениям, причем по меньшей мере один полный или неполный антиген по меньшей мере одного белка дикого типа или мутантного белка, соответствующий компоненту (I), выбран из группы, состоящей из следующих белков дикого типа и их известных мутантов: Her-2/neu, андрогенный рецептор, эстрогенный рецептор, midkine-рецептор, рецептор EGF, рецептор ERBB2, ERBB4, рецептор TRAIL, FAS, рецептор TNF α , рецептор TGF- β , лактоферриновый рецептор, основной миелин, α -лактальбумин, GFAP, фибриллярный кислый белок, тирозиназа, EGR-1, MUC1, c-Raf (Raf-1), A-Raf, B-Raf, B-RafV599E, B-RafV600E, B-Raf KD, домен киназы B-RafV600E, B-Raf V600E KD, домен киназы KD B-RafV600E, домен киназы B-Raf, домен киназы KD B-Raf, N-Ras, K-Ras, H-Ras, Bcl-2, Bcl-X, Bcl-W, Bfl-1, Brag-1, Mcl-1, A1, Bax, BAD, Bak, Bcl-Xs, Bid, Bik, Hrk, Bcr/abl, Myb, C-Met, IAP1, IAO2, XIAP, ML-IAP LIVIN, сурвивин, APAF-1, циклин D(1-3), циклин E, циклин A, циклин B, циклин H, Cdk-1, Cdk-2, Cdk-4, Cdk-6, Cdk-7, Cdc25C, p16, p15, p21, p27, p18, pRb, p107, p130, E2F(1-5), GAAD45, MDM2, PCNA, ARF, PTEN, APC, BRCA, Akt, PI3K, mTOR, p53 и гомологи, C-Мус, NF κ B, c-Jun, ATF-2, Sp1, простатаспецифический антиген (PSA), карциноэмбриональный антиген, α -фетопротеин, PAP; PSMA; STEAP; MAGE, MAGE-1, MAGE-3, NY-ESO-1, PSCA,

MART, Grp100, тирозиназа, GRP, TCF-4, вирусные антигены вирусов ВИЧ, HPV, HCV, HPV, EBV, CMV, HSV, вируса гриппа, вируса гриппа типа А, вируса гриппа типа А (H5N1) и (H3N2), вируса гриппа типа В, вируса гриппа типа С; гемагглютининов, гемагглютинина Н1, гемагглютинина Н5, гемагглютинина Н7, гемагглютинина НА1
 5 (предпочтительно из вируса гриппа А (А/Thailand/1 (KAN-1)2004(H5N1), гемагглютинина НА12 (предпочтительно из вируса гриппа А (А/Thailand/1(KAN-1)2004(H5N1), гемагглютинина НА12С (предпочтительно из вируса гриппа А (А/Thailand/1(KAN-1)2004(H5N1), нейрамидазы, р60, LLO, уреазы, CSP, калфлагина
 10 и/или СРВ".

В еще одном предпочтительном варианте осуществления предусматривают микроорганизм, соответствующим вышеприведенным определениям, причем по меньшей мере один полный или неполный антиген по меньшей мере одного белка дикого типа или мутантного белка, соответствующий компоненту (I), выбран из
 15 группы киназ, состоящей из следующих белков дикого типа и их известных мутантов (регистрационные номера приводят в скобках: AAK1 (NM 014911), AATK (NM 004920), ABU (NM 005157), ABL2(NM 005158), ACK1 (NM 005781), ACVR1 (NM 001105), ACVR1 B (NM 020328), ACVR2 (NM 001616), ACVR2B (NM 001106), ACVRL1 (NM 000020), ADCK1 (NM 020421), ADCK2 (NM 052853), ADCK4 (NM 024876), ADCK5 (NM 174922), ADRBK1 (NM 001619), ADRBK2 (NM 005160), AKT1 (NM 005163), AKT2 (NM 001626), AKT3 (NM 005465), ALK (NM 004304), ALK7 (NM 145259), ALS2CR2 (NM 018571), ALS2CR7 (NM 139158), AMHR2 (NM 020547), ANKK1 (NM 178510), ANKRD3 (NM 020639), APEG1 (NM 005876), ARAF (NM 001654), ARK5 (NM 014840), ATM (NM 000051), ATR (NM 001184), AURKA (NM 003600), AURKB (NM 004217), AURKC (NM 003160), AXL (NM 001699), BCKDK (NM 005881), BCR (NM 004327), BIKE(NM 017593), BLK (NM 001715), BMPR1 A(NM 004329), BMPR1 B (NM 001203), BMPR2 (NM 001204), BMX (NM 001721), BRAF (NM 004333), BRD2 (NM 005104), BRD3 (NM 007371), BRD4 (NM 014299), BRDT (NM 001726), BRSK1 (NM 032430), BRSK2 (NM 003957), BTK (NM 000061), BUB1 (NM 004336), BUB1 B (NM 001211), CAB31 (NM 020247), CAMK1 (NM 003656), CaMK1b (NM 198452), CAMK1 D (NM 020397), CAMK1 G (NM 020439), CAMK2A (NM 015981), CAMK2B (NM 001220), CAMK2D (NM 001221), CAMK2G (NM 001222), CAMK4 (NM 001744), CAMKK1 (NM 032294), CAMKK2 (NM 006549), CASK (NM 003688), CCRK (NM 012119), CDC2 (NM 001786), CDC2L1 (NM 001787), CDC2L5 (NM 003718), CDC42BPA (NM 014826), CDC42BPB (NM 006035), CDC7L1 (NM 003503), CDK10 (NM 003674), CDK11 (NM 015076), CDK2 (NM 001798), CDK3 (NM 001258), CDK4 (NM 000075), CDK5 (NM 004935), CDK6 (NM 001259), CDK7 (NM 001799), CDK8 (NM 001260), CDK9 (NM 001261), CDKL1 (NM 004196), CDKL2 (NM 003948), CDKL3 (NM 016508), CDKL4 (NM 001009565), CDKL5 (NM 003159), CHEK1 (NM 001274), CHUK (NM 001278), CIT (NM 007174), CLK1 (NM 004071), CLK2 (NM 003993), CLK3 (NM 003992), CLK4 (NM 020666), CRK7 (NM 016507), CSF1 R (NM 00521 1), CSK (NM 004383), CSNK1 A1 (NM 001892), CSNK1 D (NM 001893), CSNK1 E (NM 001894), CSNK1 G1 (NM 022048), CSNK1 G2 (NM 001319), CSNK1 G3 (NM 004384), CSNK2A1 (NM 001895), CSNK2A2 (NM 001896), DAPK1 (NM 004938), DAPK2 (NM 014326), DAPK3 (NM 001348), DCAMKL1 (NM 004734), DCAMKL2(NM 152619), DCAMKL3 (XM 047355), DDR1 (NM 013993), DDR2 (NM 006182), DMPK (NM 004409), DMPK2 (NM 017525.1), DYRK1 A (NM 001396), DYRK1 B (NM 006484), DYRK2 (NM 006482), DYRK3 (NM 003582), DYRK4 (NM 003845), EEF2K (NM 013302), EGFR (NM 005228), EIF2AK3 (NM 004836), EIF2AK4 (NM_001013703), EPHA1 (NM 005232), EPHA10 (NM 001004338), EPHA2 (NM 004431), EPHA3 (NM 005233), EPHA4 (NM 004438), EPHA5 (NM 004439),

EPHA6 (XM 114973), EPHA7 (NM 004440), EPHA8 (NM 020526), EPHB1 (NM 004441),
 EPHB2 (NM 017449), EPHB3 (NM 004443), EPHB4 (NM 004444), EPHB6 (NM 004445),
 ERBB2 (NM 004448), ERBB3 (NM 001982), ERBB4 (NM 005235), ERK8 (NM 139021),
 ERN1 (NM 001433), ERN2 (NM 033266), FASTK (NM 025096), FER (NM 005246), FES
 5 (NM 002005), FGFR1 (NM 000604), FGFR2 (NM 022970), FGFR3 (NM 000142), FGFR4
 (NM 022963), FGR (NM 005248), FLJ23074 (NM 025052), FLJ23119 (NM 024652),
 FLJ23356 (NM 032237), FLT1 (NM 002019), FLT3 (NM 0041 19), FLT4 (NM 002020),
 FRAP1 (NM 004958), FRK (NM 002031), FYN (NM 002037), GAK (NM 005255), GPRK5
 10 (NM 005308), GPRK6 (NM 002082), GPRK7 (NM 139209), GRK4 (NM 005307), GSG2 (NM
 031965), GSK3A (NM 019884), GSK3B (NM 002093), GUCY2C (NM 004963), GUCY2D
 (NM 000180), GUCY2F (NM 001522), H11 (NM 014365), HAK(NM 052947), HCK (NM
 0021 10), HIPK1 (NM 152696), HIPK2 (NM 022740), HIPK3 (NM 005734), HIPK4 (NM
 144685), HRI (NM 014413), HUNK(NM 014586), ICK (NM 016513), IGF1 R (NM 000875),
 15 IKBKB (NM 001556), IKBKE (NM 014002), ILK (NM 004517), INSR (NM 000208), INSR
 (NM 014215), IRAKI (NM 001569), IRAK2 (NM 001570), IRAK3 (NM 007199), IRAK4 (NM
 016123), ITK (NM 005546), JAK1 (NM 002227), JAK2 (NM 004972), JAK3 (NM 000215),
 KDR (NM 002253), KIS (NM 144624), KIT (NM 000222), KSR (XM 290793), KSR2 (NM
 20 173598), LAK(NM 025144), LATS1 (NM 004690), LATS2 (NM 014572), LCK (NM 005356),
 LIMK1 (NM 016735), LIMK2 (NM 005569), LMR3 (XM 055866), LMTK2 (NM 014916),
 LOC149420 (NM 152835), LOC51086 (NM 015978), LRRK2 (XM 058513), LTK (NM
 002344), LYN (NM 002350), MAK (NM 005906), MAP2K1 (NM 002755), MAP2K2 (NM
 030662), MAP2K3 (NM 002756), MAP2K4 (NM 003010), MAP2K5 (NM 002757), MAP2K6
 25 (NM 002758), MAP2K7 (NM 005043), MAP3K1 (XM 042066), MAP3K10 (NM 002446),
 MAP3K11 (NM 002419), MAP3K12 (NM 006301), MAP3K13 (NM 004721), MAP3K14 (NM
 003954), MAP3K2 (NM 006609), MAP3K3 (NM 002401), MAP3K4 (NM 005922), MAP3K5
 (NM 005923), MAP3K6 (NM 004672), MAP3K7 (NM 003188), MAP3K8 (NM 005204),
 30 MAP3K9 (NM 033141), MAP4K1 (NM 007181), MAP4K2 (NM 004579), MAP4K3 (NM
 003618), MAP4K4 (NM 145686), MAP4K5 (NM 006575), MAPK1 (NM 002745), MAPK10
 (NM 002753), MAPK11 (NM 002751), MAPK12 (NM 002969), MAPK13 (NM 002754),
 MAPK14 (NM 001315), MAPK3 (NM 002746), MAPK4 (NM 002747), MAPK6 (NM
 002748), MAPK7 (NM 002749), MAPK8 (NM 002750), MAPK9 (NM 002752), MAPKAPK2
 35 (NM 032960), MAPKAPK3 (NM 004635), MAPKAPK5 (NM 003668), MARK (NM 018650),
 MARK2 (NM 017490), MARK3 (NM 002376), MARK4 (NM 031417), MAST1 (NM 014975),
 MAST205 (NM 0151 12), MAST3 (XM 038150), MAST4 (XM 291 141), MASTL (NM
 032844), MATK (NM 139355), MELK (NM 014791), MERTK (NM 006343), MET (NM
 000245), MGC33182 (NM 145203), MGC42105 (NM 153361), MGC43306 (C9orf96),
 40 MGC8407 (NM 024046), MIDORI (NM 020778), MINK (NM 015716), MKNK1 (NM
 003684), MKNK2 (NM 017572), MLCK (NM 182493), MLK4 (NM 032435), MLKL (NM
 152649), MOS (NM 005372), MST1 R (NM 002447), MST4 (NM 016542), MUSK (NM
 005592), MYLK (NM 053025), MYLK2 (NM 0331 18). MY03A (NM 017433), MY03B (NM
 45 138995), NEK1 (NM 012224), NEK10 (NM 152534), NEK11 (NM 024800), NEK2 (NM
 002497), NEK3 (NM 002498), NEK4 (NM 003157), NEK5 (MGC75495), NEK6 (NM
 014397), NEK7 (NM 133494), NEK8 (NM 178170), NEK9 (NM 0331 16), NLK (NM 016231),
 NPR1 (NM 000906), NPR2 (NM 003995), NRBP (NM 013392), NRBP2 (NM 178564), NRK
 50 (NM 198465), NTRK1 (NM 002529), NTRK2 (NM 006180), NTRK3 (NM 002530), OBSCN
 (NM 052843), OSR1 (NM 005109), PACE-1 (NM 020423), PAK1 (NM 002576), PAK2 (NM
 002577), PAK3 (NM 002578), PAK4 (NM 005884), PAK6 (NM 020168), PAK7 (NM 020341),
 PASK (NM 015148), PCTK1 (NM 006201), PCTK2 (NM 002595), PCTK3 (NM 212503),

PDGFRA (NM 006206), PDGFRB (NM 002609), PDK1 (NM 002610), PDK2 (NM 002611),
 PDK3 (NM 005391), PDK4 (NM 002612), PDPK1 (NM 002613), PFTK1 (NM 012395),
 PHKG1 (NM 006213), PHKG2 (NM 000294), PIK3R4 (NM 014602), PIM1 (NM 002648),
 PIM2 (NM 006875), PIM3 (NM 001001852), PINK1 (NM 032409), PKE (NM 173575),
 5 PKMYT1 (NM 004203), pkn β (NM 013355), PLK (NM 005030), PLK3 (NM 004073),
 PRKAA1 (NM 006251), PRKAA2 (NM 006252), PRKACA (NM 002730), PRKACB (NM
 002731), PRKACG (NM 002732), PRKCA (NM 002737), PRKCB1 (NM 002738), PRKCD
 (NM 006254), PRKCE (NM 005400), PRKCG (NM 002739), PRKCH (NM 006255), PRKCI
 10 (NM 002740), PRKCL1 (NM 002741), PRKCL2 (NM 006256), PRKCM (NM 002742),
 PRKCN (NM 005813), PRKCQ (NM 006257), PRKCZ (NM 002744), PRKD2 (NM 016457),
 PRKDC (NM 006904), PRKG1 (NM 006258), PRKG2 (NM 006259), PRKR (NM 002759),
 PRKWNK1 (NM 018979), PRKWNK2 (NM 006648), PRKWNK3 (NM 020922), PRKWNK4
 (NM 032387), PRKX (NM 005044), PRKY (NM 002760), PRPF4B (NM 003913), PSKH1
 15 (NM 006742), PSKH2 (NM 033126), PTK2 (NM 005607), PTK2B (NM 004103), PTK6 (NM
 005975), PTK7 (NM 002821), PTK9 (NM 002822), PTK9L (NM 007284), PXK (NM 017771),
 QSK (NM 025164), RAD53 (NM 007194), RAF1 (NM 002880), RAGE (NM 014226), RET
 (NM 020975), RHOK (NM 002929), R10K1 (NM 031480), RIOK2 (NM 018343), RIPK1 (NM
 20 003804), RIPK2 (NM 003821), RIPK3 (NM 006871), RIPK5 (NM 015375), RNASEL (NM
 021133), ROCK1 (NM 005406), ROCK2 (NM 004850), ROR1 (NM 005012), ROR2 (NM
 004560), ROS1 (NM 002944), RPS6KA1 (NM 002953), RPS6KA2 (NM 021135), RPS6KA3
 (NM 004586), RPS6KA4 (NM 003942), RPS6KA5 (NM 004755), RPS6KA6 (NM 014496),
 RPS6KB1 (NM 003161), RPS6KB2 (NM 003952), RPS6KC1 (NM 012424), RPS6KL1 (NM
 25 031464), RYK (NM 002958), SBK (XM 370948), SCYL1 (NM 020680), SCYL2 (NM
 017988), SGK (NM 005627), SgK069 (SU SgK069), SgK085 (XM 373109), SgK110 (SU
 SgKHO), SGK2 (NM 016276), SgK223 (XM 291277), SgK269 (XM 370878), SgK424 (CGP
 SgK424), SgK493 (SU_SgK493), SgK494 (NM 144610), SgK495 (NM 032017), SGKL (NM
 30 013257), SK681 (NM 001001671), SLK (NM 014720), SMG1 (NM 015092), SNARK (NM
 030952), SNF1 LK (NM 173354), SNF1 LK2 (NM 015191), SNK (NM 006622), SNRK (NM
 017719), SRC (NM 005417), SRMS (NM 080823), SRPK1 (NM 003137), SRPK2 (NM
 003138), SSTK (NM 032037), STK10 (NM 005990), STK11 (NM 000455), STK16 (NM
 003691), STK17A (NM 004760), STK17B (NM 004226), STK18 (NM 014264), STK19 (NM
 35 032454), STK22B (NM 053006), STK22C (NM 052841), STK22D (NM 032028), STK23 (NM
 014370), STK24 (NM 003576), STK25 (NM 006374), STK3 (NM 006281), STK31 (NM
 031414), STK32B (NM 018401), STK33 (NM 030906), STK35 (NM 080836), STK36 (NM
 015690), STK38 (NM 007271), STK38L (NM 015000), STK39 (NM 013233), STK4 (NM
 40 006282), STLK5 (NM 001003787), STYK1 (NM 018423), SUDD (NM 003831), SYK (NM
 003177), TAF1 (NM 138923), TAF1 L (NM 153809), TA01 (NM 004783), TAOK1 (NM
 020791), TAOK3 (NM 016281), TBCK (NM 033115), TBK1 (NM 013254), TEC (NM
 003215), TEK (NM 000459), TESK1 (NM 006285), TESK2 (NM 007170), TEX14 (NM
 031272), TGFBR1 (NM 004612), TGFBR2 (NM 003242), TIE (NM 005424), TIF1 (NM
 45 003852), TLK1 (NM 012290), TLK2 (NM 006852), TNIK (NM 015028), TNK1 (NM 003985),
 TOPK (NM 018492), TP53RK (NM 033550), TRAD (NM 007064), TRIB1 (NM 025195),
 TRIB2 (NM 021643), TRIB3 (NM 021158), TRIM28 (NM 005762), TRIM33 (NM 015906),
 TRIO (NM 007118), TRPM6 (NM 017662), TRPM7 (NM 017672), TRRAP (NM 003496),
 TSSK4 (NM 174944), TTBK1 (NM 032538), TTBK2 (NM 173500), TTK (NM 003318), TTN
 50 (NM 003319), TXK (NM 003328), TYK2 (NM 003331), TYR03 (NM 006293), ULK1 (NM
 003565), ULK2 (NM 014683), ULK3 (NM 015518), ULK4 (NM 017886), VRK1 (NM
 003384), VRK2 (NM 006296), VRK3 (NM 016440), WEE1 (NM 003390), Wee1 B (NM

173677), YANK1 (NM 145001), YES1(NM 005433), ZAK (NM 016653), и/или ZAP70 (NM 001079)".

Термин "аллерген" в контексте настоящего изобретения относится к полным или неполным антигенам, как определено в данном контексте, которые вызывают гиперчувствительность и/или аллергические реакции. Примерами являются Der p 5 (клещи), Bet v1 (пыльца березы), Phl p 1 (пыльца злаков), Asp f I/a (*Aspergillus*), PLA 2 (пчела), Hev b (латекс) (см. статью Schmid-Grendelmeier и Cramer, 2001).

Антигены микробных и эукариотических патогенов и антигены рака яичка приведены в перечне выше.

На протяжении настоящего изобретения белковые токсины и/или их субъединицы, соответствующие компоненту (II), предпочтительно представляют собой бактериальные белковые токсины, более предпочтительно - экзотоксины.

Примерами бактериальных экзотоксинов являются токсины типа I (суперантигены), токсины типа II (порообразующие токсины) и (iii) токсины типа III (A-B токсины). В предпочтительном варианте осуществления предусматривают микроорганизм, соответствующий вышеприведенным описаниям, причем компонент (II) выбран из группы, состоящей из "бактериального токсина, энтеротоксина, экзотоксина, токсина типа I, токсина типа II, токсина типа III, токсина типа IV, токсина типа V, токсина RTX, токсина AB, токсина A-B, токсина A/B, токсина A+B, токсина A-5B и/или токсина AB5.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления предусматривают микроорганизм, соответствующий вышеприведенным описаниям, причем компонент (II) выбран из группы, состоящей из "токсина аденилатциклазы, токсина сибирской язвы, токсина сибирской язвы (EF), токсина сибирской язвы (LF), ботулинического токсина, холерного токсина (CT, Ctx), субъединицы холерного токсина B (CTB, CtxB), дифтерийного токсина (DT, Dtx), токсина *E. coli* LT, термолабильного энтеротоксина *E. coli* (LT), субъединицы B термолабильного энтеротоксина *E. coli* (LTB), токсина *E. coli* ST, термостабильного энтеротоксина *E. coli* (ST), эритрогенного токсина, токсина эксфолиатина, экзотоксина A, энтеротоксина *Perfringens*, токсина коклюша (PT, Ptx), шига-токсина (ST, Stx), субъединицы B шига-токсина (STB, StxB), шига-подобного токсина, энтеротоксинов *Staphylococcus*, столбнячного токсина (TT), токсина синдрома токсического шока (TSST-1), веро-токсина (VT), токсина A (TA) и токсина B (TB) *Clostridium difficile*, летального токсина (LT) и геморрагического токсина (HT) *Clostridium sordellii*, α -токсина (AT) *Clostridium novyi*".

Однако если холерный токсин или его субъединицу CtxB используют в качестве токсинов, соответствующих компоненту (II), представленному в изобретении, предпочтительно не использовать *Vibrio cholerae* в качестве бактериального носителя (микроорганизма).

В предпочтительном варианте осуществления предусматривают микроорганизм, соответствующий вышеприведенным определениям, причем компонент (I) и компонент (II) связаны друг с другом, чтобы обеспечить возможность экспрессии и/или секреции слитого белка, кодируемого обоими компонентами. Более предпочтительно, когда данный слитый белок выбран из группы, состоящей из "CtxB-PSA, CtxB-B-Raf V600E KD (киназа dead), CtxB-домен киназы B-Raf V600E, CtxB-домен киназы KD B-Raf V600E (киназа dead), CtxB-B-Raf, CtxB-B-Raf KD (киназа dead), CtxB-домен киназы KD B-Raf (киназа dead), CtxB-НА1 (субъединицы 1 гемагглютинаина вируса гриппа), CtxB-НА12C".

Секреция представляет собой процесс отделения, превращения и высвобождения химических агентов из клетки, либо секретлируемой химической субстанции, либо количества субстанции. Секреция не уникальна только для эукариот; она присутствует также у бактерий и архей. Транспортёры типа АТФ-связывающей кассеты распространены во всех трёх типах живых организмов. Система Sec также является другой консервативной системой, которая гомологична транслокону в эукариотическом эндоплазматическом ретикулуме, состоящему из комплекса транслокона Sec 61 у дрожжей и комплексу Sec Y-E-G у бактерий.

Грамотрицательные бактерии имеют две мембраны, делая, таким образом, секрецию более сложной. Вследствие этого у грамотрицательных бактерий имеется по меньшей мере пять специализированных систем секреции:

(1) Система секреции типа I: Такая же, как вышеупомянутые транспортёры АТФ-связывающей кассеты.

(2) Система секреции типа II: от системы Sec зависит, перейдет ли белок внутреннюю мембрану, и от другой специальной системы, перейдет ли он наружную мембрану. Бактериальные пили используют модификации системы sec, но отличаются от системы типа I.

(3) Система секреции типа III (T3SS): она гомологична бактериальному флагеллярному базальному телу. Она похожа на молекулярный шприц, через который бактерия (например, *Shigella* или *Yersinia*) может инъектировать белки в эукариотические клетки. Низкая концентрация Ca^{2+} в цитозоле отрывает вход, который регулирует T3SS. Система Hrp у патогенов растений инъектирует в растения шпильки через подобные механизмы.

(4) Система секреции типа IV: Она гомологична механизму конъюгации бактерий (и архейных жгутиковых). Она способна транспортировать как ДНК, так и белки. Она обнаружена у *Agrobacterium tumefaciens*, которая использует данную систему для интродукции Ti-плазмиды и белков хозяину, у которого развивается корончатый галл (опухоль). *Helicobacter pylori* использует систему секреции IV, чтобы ввести Cag A в эпителиальные клетки желудка. *Bordetella pertussis*, возбудитель коклюша, секретировать токсин коклюша частично посредством системы типа IV.

(5) Система секреции типа V, также называемая системой аутотранспортёров: Она использует систему sec для перехода через внутреннюю мембрану. Белки, которые используют данный путь, обладают способностью формировать β -бочку на C-конце и встраиваться в наружную мембрану для транспорта остальной части пептида из клетки. Наконец, β -бочка может отщепляться и оставаться в наружной мембране.

Некоторые считают, что из данных остатков аутотранспортёров образуются порины, которые подобны β -бочкам.

Бактерии, а также митохондрии и хлоропласты также используют много других специальных транспортных систем, таких как путь двойной транслокации аргинина (Tat), который, в противоположность Sec-зависимому экспорту, транспортирует полностью уложенные белки через мембрану. Название данной системы происходит из необходимости присутствия двух следующих друг за другом аргининов в сигнальной последовательности, требующихся для направленности на данную систему. Секреция у грамотрицательных бактерий включает преодоление внутренней и наружной мембран с помощью подходящей системы секреции, подобной, например, системе секреции Hly типа I или типа III или аутопортёру AIDA. У грамположительных бактерий система секреции должна преодолевать внутреннюю мембрану и клеточную стенку, что у большинства

штаммов может достигаться слиянием с подходящим сигналом секреции.

Подкомпонент (III-а) представляет собой по меньшей мере одну нуклеотидную последовательность, кодирующую по меньшей мере одну транспортную систему, которая обеспечивает возможность экспрессии продуктов экспрессии компонента (I) и компонента (II) на наружной поверхности микроорганизма и/или обеспечивает возможность секреции продуктов экспрессии компонента (I) и компонента (II).

Соответствующий компонент необязательно может либо секретироваться, либо экспрессироваться на мембране микроорганизма, т.е. быть связанным с мембраной.

Данные транспортные системы представляют собой, например i) систему секреции типа I, систему секреции типа II, систему секреции типа III, систему секреции типа IV, систему секреции типа V, ii) гемолизиновую транспортную систему (сигнал) *E. coli* (нуклеотидные последовательности, включающие HlyA, HlyB и HlyD под контролем hly-специфического промотора); следует использовать следующие

транспортные сигналы: для секреции - С-концевой транспортный сигнал HlyA в присутствии белков HlyB и HlyD; для связанной с мембраной экспрессии - С-концевой транспортный сигнал HlyA в присутствии белка HlyB, iii) гемолизиновую транспортную систему (сигнал) *E. coli* (нуклеотидные последовательности, включающие HlyA, HlyB и HlyD, под контролем не-hly-специфического

бактериального промотора), iv) транспортный сигнал для белка S-слоя (RsaA) *Caulobacter crescentus*; следует использовать следующие транспортные сигналы: для секреции и связанной с мембраной экспрессии - С-концевой транспортный сигнал RsaA, v) транспортный сигнал для белка TolC *Escherichia coli*; следует

использовать следующие транспортные сигналы: связанной с мембраной экспрессии - N-концевой транспортный сигнал TolC (полный мембранный белок TolC *E. coli* представляет собой многофункциональный порообразующий белок

наружной мембраны *E. coli*, который служит в дополнение к таким функциям, как прием колицина E1 (см. статью Morona et al., 1983) и секреция колицина V (см. статью Fath et al., 1991), так же как рецептор для фага U3 (см. статью Austin et al., 1990); данный белок обнаружен не только в *E. coli*, но также во множестве грамотрицательных бактерий (см. статью Wiener, 2000); локализация в наружной мембране и широкое распространение делают TolC идеальным кандидатом для представления гетерологичных антигенов, чтобы, например, вызвать иммунную реакцию.

Грамположительные бактерии не заключены в наружную мембрану. Секреция в данных случаях происходит проще и обычно не требует специального механизма секреции для транспорта через клеточную мембрану и клеточную стенку. В случае грамположительных бактерий сигналы секреции слиты по N-концу с гетерологичным белком и, как правило, необходимы и достаточны для секреции.

Белки, для которых описаны данные сигнальные последовательности, включают в основном все секретлируемые бактериальные белки. Примерами для листерий являются сигналы секреции, выделенные из листериолизина, р60 или ActA. В общем аналогичный подход применяют к эукариотическим клеткам, где сигнальная последовательность (например, универсальный сигнал секреции Vtgss), направляющая белок на эндоплазматический ретикулум в отсутствие сигнала удерживания, необходима и достаточна для секреции.

Необязательный второй подкомпонент (III-б) представляет собой по меньшей мере одну нуклеотидную последовательность, кодирующую по меньшей мере один белок для лизиса микроорганизма в цитозоле клеток млекопитающих и для

внутриклеточного высвобождения плазмид или векторов экспрессии, которые содержатся в лизированном микроорганизме. Данные литические белки (эндолизины) представляют собой, например, белки лизиса, специфические для *Listeria*, такие как PLY551 (см. статью Loessner et al., 1995) и/или специфический для *Listeria* холин под контролем промотора листерий. Предпочтительный вариант осуществления данного изобретения представляет собой комбинацию различных подкомпонентов (III-b), например комбинацию белка лизиса и холина.

Оба подкомпонента (III-a) и/или (III-b) могут быть независимо друг от друга конститутивно активными.

В предпочтительном варианте осуществления предусматривают микроорганизм, соответствующий вышеприведенным определениям, причем подкомпонент (III-a) выбран из группы, состоящей из "системы секреции типа I, системы секреции типа II, системы секреции типа III, системы секреции типа IV, системы секреции типа V, гемолизиновой системы транспорта (сигнал) *Escherichia coli* (нуклеотидные последовательности, включающие HlyA, HlyB и HlyD под контролем hly-специфического промотора), гемолизиновой системы транспорта (сигнал) *Escherichia coli* (нуклеотидные последовательности, включающие HlyA, HlyB и HlyD под контролем не-hly-специфического промотора), транспортного сигнала для белка S-слоя (Rsa A) *Caulobacter crescentus*, транспортного сигнала для белка TolC *Escherichia coli*, сигнала секреции Vtgss и/или сигналов секреции, выделенных из листериолизина, р60 и/или ActA", и причем подкомпонент (III-b) выбран из группы, состоящей из "эндолизин, литического белка грамположительных бактерий, литического белка *Listeria monocytogenes*, PLY551 *Listeria monocytogenes* и/или холина *Listeria monocytogenes*".

В следующем предпочтительном варианте осуществления такой же подкомпонент (III-a) обеспечивает возможность экспрессии продуктов экспрессии компонента (I) и компонента (II) на наружной поверхности микроорганизма и/или обеспечивает возможность секреции продуктов экспрессии компонента (I) и компонента (II). Именно в данном предпочтительном варианте осуществления подкомпонент (III-a) представляет собой по меньшей мере одну нуклеотидную последовательность, кодирующую только одну транспортную систему, которая обеспечивает возможность сопутствующей экспрессии продуктов экспрессии компонента (I) и компонента (II) на наружной поверхности микроорганизма и/или обеспечивает возможность сопутствующей секреции продуктов экспрессии компонента (I) и компонента (II), причем данный предпочтительный подкомпонент (III-a) представляет собой по меньшей мере одну нуклеотидную последовательность, кодирующую гемолизиновую транспортную систему (сигнал) *Escherichia coli* (нуклеотидные последовательности, включающие HlyA, HlyB и HlyD под контролем hly-специфического промотора) или гемолизиновую транспортную систему (сигнал) *Escherichia coli* (нуклеотидные последовательности, включающие HlyA, HlyB и HlyD под контролем не-hly-специфического бактериального промотора).

В еще одном предпочтительном варианте осуществления предусматривают микроорганизм, соответствующий вышеприведенным определениям, причем в соответствии с подкомпонентом (III-a) продукты экспрессии компонентов (I) и компонента (II) секретируются. Более предпочтительно, когда компонент (I) и компонент (II) связаны друг с другом, экспрессируются вместе в виде слитого белка, кодируемого обоими компонентами. Наиболее предпочтительно, когда данный

слитый белок выбран из группы, состоящей из "CtxB-PSA, CtxB-B-Raf V600E KD (киназа dead), CtxB-домен киназы B-Raf V600E, CtxB-B-домен киназы KD Raf V600E (киназа dead), CtxB-B-Raf, CtxB-B-Raf KD (киназа dead), CtxB-B-домен киназы KD Raf (киназа dead), CtxB-НА1 (субъединица 1 гемагглютинаина вируса гриппа), CtxB-НА12С".

На протяжении настоящего изобретения, термин "секреция" относится к секреции белкового антигена, белкового токсина и/или слитого белка токсин-антиген через обе мембраны грамотрицательной бактерии или через внутреннюю мембрану и клеточную стенку грамположительной бактерии в прилегающую среду посредством надлежащей системы секреции, такой как проиллюстрированные выше.

Поскольку известно, что при использовании системы секреции, такой как гемолизиновая система секреции типа I из *E. coli*, продукт секреции, как правило, обнаруживают во всех клеточных фракциях: цитоплазматически, ассоциированным с мембраной и локализованным в аутомембранных пузырьках и полностью секретируемым в прилегающую среду (см. статью Balsalobre et al., 2006), на протяжении настоящего изобретения не требуется, чтобы секреция была полной. Однако желательна и предпочтительна полная или почти полная секреция, т.е. большая часть полностью секретируемого продукта секреции.

Компонент (IV) представляет собой по меньшей мере одну нуклеотидную последовательность для по меньшей мере одной последовательности активации для экспрессии одного или более компонентов (I) - (III), причем указанная последовательность активации может быть активирована в микроорганизме и/или является специфической для клетки ткани, специфической для опухолевой клетки, макрофаг-специфической, дендрит-специфической, лимфоцит-специфической, функция-специфической или неспецифической в отношении клетки.

Если экспрессия является мембрана-связанной на наружной поверхности микроорганизма, то предпочтительно, когда последовательность активации выбирают так, чтобы она была способна активироваться в микроорганизме. Данные последовательности активации представляют собой, например: i) конститутивно активные промоторные участки, такие как промоторный участок с "сайтом связывания рибосом" (RBS) гена β -лактамазы *E. coli* или гена *tetA* (см. статью Busby и Ebright, 1994), эндогенный промотор локуса *hly* *E. coli*; ii) промоторы, которые способны индуцироваться, предпочтительно промоторы, которые становятся активными после входа в клетку. К ним принадлежит промотор *actA* *L. monocytogenes* (см. статью Dietrich et al., 1998) или промотор *ragC* *S. typhimurium* (см. статью Bumann, 2001).

Если плазмиды высвобождаются из микроорганизма после его лизиса в цитозоле клетки млекопитающего, последовательность активации не является специфической в отношении клетки, но специфической в отношении клетки ткани, специфической в отношении клеточного цикла или функция-специфической. Предпочтительно, когда выбирают такие последовательности активации, которые особенно активируются в макрофагах, дендритных клетки и лимфоцитах.

В следующем предпочтительном варианте осуществления предусматривают микроорганизм, соответствующий вышеприведенным определениям, в котором компонент (I) выбран из группы, состоящей из B-Raf V600E, домена киназы B-Raf V600E, B-Raf V600E KD (киназа dead), домена киназы KD B-Raf V600E (киназа dead), B-Raf KD (киназа dead), домена киназы B-Raf, домена киназы KD B-Raf (киназа dead), простата-специфического антигена (PSA), гемагглютинаина НА1 (предпочтительно из

вируса гриппа А (А/Thailand/1(KAN-1)2004(H5N1), гемагглютинина HA12 (предпочтительно из вируса гриппа А (А/Thailand/1(KAN-1)2004(H5M1), гемагглютинина HA12С (предпочтительно из вируса гриппа А (А/Thailand/1 (KAN-1)2004(H5N1)"; компонент (II) выбран из группы, состоящей из "субъединицы В холерного токсина (СТВ, StxB), субъединицы В термолabileного энтеротоксина E. coli (LTB), столбнячного токсина (TT)"; подкомпонент (III-а) выбран из группы, состоящей из "сигнала гемолизинного транспорта HlyA Escherichia coli вместе с компонентами системы секреции Hly (нуклеотидными последовательностями, включающими HlyA, HlyB и HlyD под контролем hly-специфического промотора)"; компонент (IV) выбран из группы, состоящей из "эндогенного промотора локуса hly E. coli", причем компонент (I) и компонент (II) связаны друг с другом, чтобы обеспечить возможность экспрессии слитого белка, кодируемого обоими компонентами, и причем слитый белок секретируется.

Проиллюстрированные выше микроорганизмы, соответствующие компонентам (I)-(IV), а также предпочтительные варианты осуществления далее называют микроорганизмами, соответствующими изобретению.

Микроорганизмы, соответствующие изобретению, преимущественно подходят для использования в противоопухолевой терапии в качестве живых вакцин в ходе получения направленности на опухоль. Именно посредством микроорганизмов, соответствующих изобретению, которые действуют как носители генетической информации, гетерологичные антигены совместно с белковыми токсинами транспортируются в область опухоли, экспрессируются как слитые белки и секретируются *in situ*.

Микроорганизмы, соответствующие изобретению, неожиданно и преимущественно характеризуются посредством эффективной и повышенной экспрессии и секреции транспортируемых, кодируемых и экспрессируемых слитых белков токсин-антиген, т.е. никакие цитоплазматические и/или периплазматические агрегаты не присутствуют.

Более того, путем введения микроорганизмов, соответствующих изобретению, неожиданно вызывают сильный системный клеточный ответ иммунной системы по сравнению с перорально вводимыми белковыми вакцинами, которые, напротив, индуцируют системную толерантность иммунной системы.

Наиболее заметно, что, кроме индукции системного клеточного ответа иммунной системы Th1-типа, микроорганизмы, соответствующие изобретению, вызывают активацию цитотоксических Т-клеток (CTL) CD⁸⁺ с рестрикцией МНС класса I и сильно повышают данный иммунный ответ CTL.

Кроме того, в дополнение к индукции и/или повышению уровня сильных клеточных системных Th1- и CTL-ответов иммунной системы врожденная иммунная система, например NK-клетки, NKT-клетки и/или γ - δ Т-клетки, также неожиданно активируются микроорганизмами, соответствующими изобретению, синергическим образом.

При использовании холерного токсина в качестве компонента токсина, микроорганизмы, соответствующие изобретению, обладают преимуществом в том, что у человека отсутствует обычно существующий конституциональный иммунитет против токсина (в отличие от столбнячного токсина, например, вследствие противостолбнячной вакцинации в детстве). Вследствие этого предпочтительно использование холерного токсина и/или его субъединиц, в частности, StxB.

Микроорганизмы, соответствующие изобретению, особенно подходят для

перорального применения в направленной противоопухолевой (иммуно)терапии на основе живой вакцины. Вследствие этого можно улучшить соблюдение пациентами режима и схемы лечения.

Однако микроорганизмы, соответствующие изобретению, не ограничены применением только в противоопухолевой терапии. В принципе микроорганизмы, соответствующие изобретению, подходят также для лечения и/или профилактики всех данных заболеваний, для которых требуется терапия, в которой обязательна индукция системного клеточного Th1-ответа иммунной системы. Примеры данных инфекционных заболеваний включают, но без ограничения перечисленным, ВИЧ, грипп, HCV и другие вирусные болезни, *Mycobacterium tuberculosis*, *Listeria monocytogenes* и другие бактериальные заболевания.

Микроорганизмы, соответствующие изобретению, в полной мере подходят для лечения заболеваний, подобных гриппу, при которых необходима оптимальная защита посредством комбинации ответа иммунной системы слизистых и системного клеточного иммунного ответа. Кроме того, их можно было бы использовать для специфической индукции Th1-подобного иммунитета при аллергических заболеваниях, например аллергическом рините. В данном случае антиген представлял бы собой аллерген, который сливают с компонентом белкового токсина, и принцип действия соответствующей вакцины состоял бы в сдвиге иммунного ответа с Th2-преобладающего иммунного ответа в отношении аллергена при аллергических реакциях (заболеваниях) к Th1-иммунному ответу.

Предпочтительным способом введения является пероральное введение. В предпочтительном варианте осуществления штамм *Salmonella*, соответствующий данному изобретению, ферментируют в подходящей среде, собирают и промывают центрифугированием и затем получают и стабилизируют с использованием соответствующих субстанций и лиофилизируют. Лيوфилизированной субстанцией наполняют устойчивые в желудке капсулы, содержащие количества живых клеток предпочтительно от 10^9 до 10^{10} бактерий. Капсулы перорально принимают с жидкостью.

Альтернативно лиофилизированные бактерии, как описано выше, распространяют вместе с пакетиками, содержащими буфер, который может нейтрализовать желудочную кислоту (фармацевтический набор). В предпочтительном варианте осуществления данный буфер представляет собой карбонатный буфер. Непосредственно перед применением буфер готовят с водой и принимают, сразу после этого принимают лиофилизированные бактерии, смешанные с водой.

Еще одной альтернативой является использование замороженных бактерий. В данном случае после промывания бактерии стабилизируют с помощью стабилизатора, предпочтительно сахарозы или глицерина, и затем замораживают и хранят при -80°C , предпочтительно в концентрациях от 10^9 до 10^{10} бактерий/дозу. Предпочтительно, когда данный препарат используют в фармацевтическом наборе, как описано выше, в сочетании с карбонатным буфером.

В предпочтительном варианте осуществления предусматривают фармацевтическую композицию, включающую по меньшей мере один микроорганизм, соответствующий изобретению, предпочтительно по меньшей мере один лиофилизированный микроорганизм, соответствующий изобретению, и фармацевтически приемлемый носитель, предпочтительно капсулы.

Компоненты (I)-(IV), соответствующие настоящему изобретению, вводят в

микроорганизмы, соответствующие изобретению, способами, хорошо известными специалисту в области техники. Если микроорганизмы представлены бактериями, компоненты вводят в плазмиды или векторы экспрессии, и плазмиды или векторы экспрессии переносят в бактерии. Способы молекулярно-биологического клонирования и трансформации, пригодные для получения плазмид, векторов экспрессии и микроорганизмов, соответствующих изобретению, хорошо известны специалисту в области техники и представляют собой рутинную экспериментальную работу.

Другим объектом изобретения является введение лекарственного препарата, включающего микроорганизмы, соответствующие изобретению. Введение проводят местно или системно, например орально, перорально, ректально, в эпидермис, подкожно, внутримышечно, в полость тела, в орган, в опухоль или в кровоток.

Данные лекарственные препараты представляют собой, например, суспензии микроорганизмов, соответствующих изобретению, в растворах, известных фармацевтам, подходящих для инъекций.

В частном варианте осуществления, предметом настоящего изобретения является пероральное или ректальное введение лекарственного препарата, соответствующего изобретению, для лечения и/или профилактики заболеваний. Введение проводят однократно или несколько раз. При каждом введении вводят приблизительно $10-10^{11}$ микроорганизмов, соответствующих изобретению. Если введение данного количества микроорганизмов, соответствующих изобретению, не вызывает достаточной иммунной реакции, количество, предназначенное для инъекции, увеличивают.

После введения микроорганизмов, соответствующих изобретению, толерантность в отношении клетки, презентующей компонент (I), например, опухолевой клетке или клетке ткани, из которой происходит опухоль, нарушается и запускается сильный системный иммунный ответ, направленный на опухоль и/или клетки ее ткани. В зависимости от выбора компонента (I) данная клеточная иммунная реакция направлена либо исключительно в отношении опухоли, либо, кроме того, в отношении опухолевых клеток, включающих клетки ткани, из которой происходят опухолевые клетки.

В другом аспекте задачей настоящего изобретения является получение лекарственного препарата, включающего по меньшей мере один микроорганизм, соответствующий изобретению, включающий проиллюстрированные выше генетические компоненты (I) - (IV) или по меньшей мере одну фармацевтическую композицию, как определено в данном контексте.

В предпочтительном варианте осуществления микроорганизмы, соответствующие изобретению, могут быть использованы для получения лекарственного препарата для лечения и/или профилактики физиологических и/или патофизиологических состояний, выбранных из группы, состоящей из "неконтролируемого деления клеток, злокачественных опухолей, доброкачественных опухолей, солидных опухолей, сарком, карцином, гиперпролиферативных нарушений, карциноидов, сарком Эвинга, сарком Капоши, опухолей головного мозга, опухолей, происходящих из головного мозга, и/или нервной системы, и/или мозговых оболочек, глиом, нейробластом, рака желудка, рака почки, карциномы почечных клеток, рака простаты, карцином простаты, опухолей соединительных тканей, сарком мягких тканей, опухолей поджелудочной железы, опухолей печени, опухолей головы, опухолей шеи, рака пищевода, рака щитовидной железы, остеосарком,

ретинобластом, тимомы, рака яичка, рака легкого, бронхиальных карцином, рака молочной железы, карцином молочной железы, рака кишки, колоректальных опухолей, карцином толстой кишки, карцином прямой кишки, гинекологических опухолей, опухолей яичника/овариальных опухолей, рака матки, рака шейки матки, карцином шейки матки, рака тела матки, карцином тела, эндометриальных карцином, рака мочевого пузыря, рака полости, рака кожи, базалиом, спиналиом, меланом, внутриглазных меланом, лейкоза, хронического лейкоза, острого лейкоза, лимфом, инфекции, вирусной или бактериальной инфекции, гриппа, хронического воспаления, отторжения органа и/или аутоиммунных заболеваний".

Бактериальные инфекции включают, но без ограничения перечисленным, сибирскую язву, бактериальный менингит, ботулизм, бруцеллез, камплобактериоз, болезнь кошачьих царапин, холеру, дифтерию, эпидемический тиф, импетиго, легионеллез, лепру (болезнь Гансена), лептоспироз, листериоз, лаймскую болезнь, мелиоидоз, инфекцию MRSA (метициллин-резистентных стафилококков), нокардиоз, коклюш (судорожный кашель), чуму, пневмококковую пневмонию, пситтакоз, Ку-лихорадку, пятнистую лихорадку Скалистых гор (RMSF), сальмонеллез, скарлатину, шигеллез, сифилис, столбняк, трахому, туберкулез, туляремию, брюшной тиф, тиф, инфекции мочевых путей, вызываемые бактериями сердечные заболевания.

Вирусные инфекции включают, но без ограничения перечисленным, СПИД, связанный со СПИДом комплекс (ARC), ветрянку (ветряную оспу), простуду, цитомегаловирусную инфекцию, колорадскую клещевую лихорадку, лихорадку Денге, геморрагическую лихорадку Эбола, ящур, гепатит, простой герпес, опоясывающий лишай, HPV, инфлюэнцу (грипп), лихорадку Ласса, корь, марбургскую геморрагическую лихорадку, инфекционный мононуклеоз, паротит, полиомиелит, прогрессирующую многоочаговую лейкоэнцефалопатию, бешенство, краснуху, CAPC (атипичную пневмонию), оспу (натуральную оспу), вирусный энцефалит, вирусный гастроэнтерит, вирусный менингит, вирусную пневмонию, лихорадку Западного Нила, желтую лихорадку.

Хронические воспаления или хронические воспалительные заболевания включают, но без ограничения перечисленным, хронический холецистит, бронхектаз, ревматоидный артрит, тиреоидит Хашимото, воспалительную болезнь кишки (язвенный колит и болезнь Крона), силикоз и другой пневмокониоз.

Аутоиммунные заболевания включают, но без ограничения перечисленным, системные синдромы, такие как SLE, синдром Шегрена, склеродерму, ревматоидный артрит и полимиозит, а также местные синдромы, такие как IDDM (инсулинозависимый сахарный диабет), тиреоидит Хашимото, болезнь Аддисона, обыкновенная пузырчатка, псориаз, атопический дерматит, атопический синдром, астма, аутоиммунная гемолитическая анемия, рассеянный склероз.

Соответствующие лекарственные препараты, включающие по меньшей мере один микроорганизм, как описано в данном контексте, или по меньшей мере одну фармацевтическую композицию, как определено в данном контексте согласно всем описанным в данном контексте вариантам осуществления, предназначенным для применения для лечения и/или профилактики физиологических и/или патофизиологических состояний, как описано и определено в данном контексте, также включены в настоящее изобретение.

В другом аспекте задачей настоящего изобретения является получение плазмиды или вектора экспрессии, включающих компоненты (I)-(IV), как проиллюстрировано в данном контексте. Предпочтительным является микроорганизм, соответствующий

изобретению, который несет по меньшей мере одну плазмиду или вектор экспрессии, включающие компоненты (I)-(IV), как проиллюстрировано в данном контексте.

В другом аспекте задачей настоящего изобретения является осуществление способа получения микроорганизма, соответствующего изобретению, причем получают плазмиду или вектор экспрессии, как проиллюстрировано в данном контексте, и трансформируют микроорганизм данной плазмидой или вектором экспрессии.

В другом аспекте задачей настоящего изобретения является способ получения фармацевтического набора, включающего по меньшей мере один микроорганизм, соответствующий изобретению, или фармацевтическую композицию, как описано выше, либо лекарственный препарат, как описано выше, и фармакологически приемлемый буфер, предпочтительно карбонатный буфер.

Краткое описание чертежей

На фигуре 1 представлена нуклеотидная последовательность (5'>3') сигнала секретиции гемолизина А (hlyA) *E. coli*. Сайт NsiI подчеркнут.

На фигуре 2 представлена нуклеотидная последовательность (5'>3') гемолизина В (NlyB) *E. coli* транспортной системы типа 1 гемолизина *E. coli*.

На фигуре 3 представлена нуклеотидная последовательность (5'>3') гемолизина D (MyD) *E. coli* транспортной системы типа 1 гемолизина *E. coli*.

На фигуре 4 представлена нуклеотидная последовательность (5'-3') человеческого простата-специфического антигена (PSA) без сигнального пептида, регистрационный номер M26663 (мРНК простата-специфического антигена *Homo*, полные cds), участок 100-807 (соответствующий пептид: AA 26-261).

На фигуре 5 представлена нуклеотидная последовательность (5'>3') субъединицы В холерного токсина (CtxB) без сигнального пептида, охватывающий участок 204-494, регистрационный номер K01170 (гены toxA и toxB *Vibrio cholerae* для субъединиц A2 холерного энтеротоксина A2 (γ)).

На фигуре 6 представлена нуклеотидная последовательность (5'-3') домена киназы B-Raf (B-Raf KD) человеческого белка B-raf (BRAF), регистрационный номер M95712 (мРНК белка B-raf *Homo sapiens* (BRAF), полные cds), участок 1403-2359 без участка 1448-1477 (соответствующий пептид: AA 448-766 без AA 463-472), включающий мутацию V600E.

На фигуре 7 представлена нуклеотидная последовательность (5'>3') эпитопа человеческого B-Raf V600E с рестрикцией HLA B27.

На фигуре 8 представлена нуклеотидная последовательность (5'>3') генетически слитой конструкции CtxB - PSA - NlyA.

На фигуре 9 представлена нуклеотидная последовательность (5'>3') генетически слитой конструкции Ctx - B-Raf V600E - NlyA.

На фигуре 10 представлена нуклеотидная последовательность (5'>3') генетически слитой конструкции CtxB - домен киназы KD B-Raf V600E - NlyA.

На фигуре 11 представлена функциональная экспрессия и секреция слитых белков PSA-CtxB в различных видах бактерий, рекомбинантных по рMKhly-PSA-CtxB.

На фигуре 12 представлены спленоциты, секретирующие ИФН- γ , в качестве меры ответов Т-клеток CD⁸⁺ и врожденной иммунной системы (NK-клеток) у мышей, иммунизированных различными живыми вакцинными носителями.

На фигуре 13 представлено уменьшение объема опухоли в ответ на иммунизацию различными живыми вакцинными носителями.

На фигуре 14 представлены спленоциты, секретирующие ИФН- γ , в качестве меры

ответов Т-клеток CD8⁺ и врожденной иммунной системы (NK-клеток) у мышей, иммунизированных различными живыми вакцинами, несущими различные иммунологические адъюванты со слитыми конструкциями CtxB-OVA.

На фигуре 15 представлена эффективная экспрессия и функциональная секреция слитых белков гемагглютинин H1 куриного гриппа - CtxB в ветеринарном вакцинном штамме, включающем полную последовательность гемагглютинина H5N1 (HA1+HA2, представлено, HA12) без трансмембранного участка (HA12c). Живая аттенюированная *Salmonella enterica*, серовар Ty-phimurium vacT (gyrA D87G) и живая аттенюированная *Salmonella enterica* серовар Enteritidis vacE (штамм Sm24/Rif12/Ssq), обе фирмы Lohmann Animal Health GMBH & CO KG.

На фигуре 16 представлена нуклеотидная последовательность, кодирующая слитый белок CtxB-HA12c-HlyA.

На фигуре 17 представлена экспрессия и секреция слитого белка с использованием вектора pMBKDC, электропорированного в штамм *Salmonella typhi* Ty21a и другие бактериальные штаммы:

А) ряды A1-A3: Анализ супернатанта согласно TP StMoBKDC с использованием антитела к B-Raf для детекции. Ряд A1: *S. typhi* Ty21a pMoBKDC, A2: *S. typhi* Ty21a, A3: *S. typhimurium* aroA. Слитый белок BRaf-V600E KD-CtxB отмечен вверх стрелкой и имеет предполагаемый размер приблизительно 48 кД. Белковый маркер: предварительно окрашенная белковая лестница Bench-Mark, No 10748-010.

В) анализ, аналогичный А с использованием недавно полученного антитела к HlyA в качестве антитела для детекции. Ряды 1 и 2: конструкции StMoPC, ряд 3: *S. typhi* Ty21a MoBKDC; ряд 4: *E. coli* MoBKDC, ряд 5: *S. typhi* Ty21a, ряд 6: *S. typhimurium* aroA. Белковый маркер: предварительно окрашенная белковая лестница Bench-Mark, No 10748-010 Invitrogen BenchMark, партия 1315592.

На фигуре 18 представлена полная нуклеотидная последовательность (5'>3') ненагруженного вектора pMKhlyi.

Содержание всех приведенных ссылок и патентов таким образом включено в данное описание в виде ссылки во всей их полноте. Изобретение более подробно раскрывается с помощью следующих примеров, однако без ограничения ими.

Осуществление изобретения

Примеры

Пример 1: Конструирование, экспрессия и секреция слитых белков PSA-CtxB в различных штаммах бактериальных носителей

Для доказательства осуществимости и демонстрации эффективности системы секреции гемолизина типа I *E. coli* секретировать слитые белки опухолевых антигенов, в данном случае простата-специфического антигена (PSA), и компонентов белковых токсинов, в данном случае CtxB, в качестве адъюванта конструируют слитый белок PSA-CtxB, как описано в данном контексте. Экспрессию и секрецию исследуют на различных грамотрицательных бактериальных штаммах, которые потенциально эффективны в качестве живых вакцинных штаммов в противоопухолевой терапии. Молекулярно-биологическое клонирование основано на плазмиде/векторе экспрессии pMOhlyl, которые описаны ранее (см. статьи Gentshev et al., 2005; Gentshev et al., 1996, WO 03/072789).

1А Конструирование устойчивого к к анамизину производного вектора экспрессии pMOhlyl

Замену кассеты устойчивости кампициллину pMOhlyl осуществляют, как описано в статье Datsenko и Wanner, 2000.

Вкратце, смысловой праймер P1 (5'-GAGTATTCAACATTTCCGTGTCGC
CCTTATCCCTTTTTTGGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC-S') и антисмысловой праймер
 P2 (5'-

GCGATCTGTCTATTTTCGTTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCC

5 САТАТГААТАТССТССТТА-S') и плазмиду pKD4 в качестве матрицы используют для
 ПЦР с целью получения фрагмента, несущего ген устойчивости к канамицину (Kan^R),
 фланкированный участками, гомологичными гену устойчивости к ампициллину
 (неподчеркнутые). Штамм E. coli BW251 14, несущий плазмиду pKD46 и
 10 направленную плазмиду pMOhlyl, выращивают при 37°C в среде LB (Difco) с
 добавлением 0,2% L-(+)-арабинозы в течение 3-4 часов перед трансформацией ПЦР-
 фрагментом.

После трансформации бактериальные клетки распределяют на пластинках
 агара LB, содержащего 25 мкг/мл канамицина, и инкубируют при 37°C в течение
 15 ночи. На следующий день клоны Kan^R снимают и инкубируют в течение
 дополнительных 48 ч в среде LB, содержащей 50 мкг/мл канамицина, чтобы
 избавиться от всех плазмид, обуславливающих устойчивость к ампициллину.

Наконец, селектируют клоны с Kan^R и чувствительным к ампициллину фенотипом.
 20 Замену гена ApR кассетой Kan^R подтверждают с помощью ПЦР и секвенирования.
 Полученную в результате плазмиду называют pMKhlyl.

1B Клонирование плазмиды pMKhly-PSA

Смысловой праймер PSA-Nsi1 (5'-GATTGGTGATGCATCCCTCAT-S';
 25 рестрикционные сайты NsiI подчеркнуты) и антисмысловой праймер PSA-Nsi2 (5'-
 GGTGCTCATGCATTGGCCACG-3') используют для амплификации фрагмента ДНК,
 кодирующего PSA, с помощью ПЦР. ПЦР проводят в циклере Thermal Cycler 60
 (Biometra, Göttingen, Germany) в течение 30 циклов при 94°C в течение 1 мин, 54°C в
 течение 1 мин и 72°C в течение 2 мин.

30 После разрезания рестрикционным ферментом NsiI фрагмент ДНК, несущий
 ген psa вводят в единственный сайт NsiI экспортирующего вектора pMKhly1.
 Полученную в результате плазмиду pMKhly-PSA выделяют из E. coli
 DH5α (Invitrogen, Germany), анализируют с использованием рестрикционного
 анализа и секвенируют.

35 1C Клонирование плазмиды pMKhly-PSA/CtxB

Смысловой праймер P_{tac}-Sall (5'-
 АААААAGTCGACGGCTGTGCAGGTCGТААТCACTGC-3') и антисмысловой
 праймер P_{tac}-NotI (5'-АААААAGCGGCCGCGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCC-3')
 40 используют для амплификации с помощью ПЦР фрагмента ДНК из 201 пары
 оснований, кодирующего промотор P_{tac} из плазмиды pGEX-6p-1 (Amersham
 Bioscience, Germany). ПЦР проводят в термоциклере T3 (Biometra, Germany): в
 течение 30 циклов при 95°C в течение 30 сек, 55°C в течение 30 сек и 72°C в течение 90
 сек. Смысловой праймер Rbs-NotI-прямой (5'-
 45 АААААAGCGGCCGCTAAGGATGAATTATGATTAААТТААААТТТGG-S') и
 антисмысловой праймер ctb-Sall обратный (5'-
 ТТТАТАGTCGACTTAATTTGCCATACTAATTGCGGCAATCGC-S') используют для
 амплификации с помощью ПЦР фрагмента ДНК из 413 пар оснований,
 50 кодирующего сайт связывания рибосом, и полной кодирующей CtxB из V. cholerae El
 tor. ПЦР проводят в термоциклере T3 (Biometra, Germany): стадия 1-30 циклов при
 95°C в течение 30 сек, 50°C в течение 30 сек и 72°C в течение 2 мин. После очистки с
 помощью набора Qiaquick PCR Purification Kit (Qiagen, Germany) и разрезания обоих

фрагментов рестрикционным ферментом NotI два фрагмента лигируют, получая в результате фрагмент из 594 пар оснований P_{tac}-ctxB. Полученный в результате фрагмент также очищают и после разрезания рестрикционным ферментом Sail фрагмент P_{tac}-ctxB вводят в единственный сайт Sail экспортирующего

5 вектора pMKhly-PSA. Полученную в результате плазмиду pMKhly-PSA/CtxB выделяют из *E. coli* DH5 α (Invitrogene, Germany), анализируют и секвенируют.

1D Клонирование слитой конструкции PSA-CtxB-HlyAs

Смысловый праймер 5'ctxB NsiI (5'-

10 GCATATGCACATGCATCACCTCAAAATATTAAGTAT-3') и антисмысловой праймер 3' ctxB SrfI NsiI (5'-

GGCTTTTTTATATCTTATGCATGCCCCGGGCATTGCGGCAATCGC-3') (сайт SrfI выделен жирным шрифтом) используют для амплификации посредством ПЦР

фрагмента ДНК из ~300 пар оснований, представляющего ген ctxB из *V. cholerae* El tor. После очистки с помощью набора Qiaquick PCR Purification Kit (Qiagen, Germany) и разрезания рестрикционным ферментом NsiI фрагмент ДНК, несущий целый ген ctxB без N-концевой сигнальной последовательности вводят в единственный сайт NsiI экспортирующего вектора pMKhly1. Полученную в результате плазмиду pMKhly-CtxB выделяют из *E. coli* DH5 α (Life Technologies), анализируют и секвенируют.

20 Человеческий ген psa амплифицируют из плазмиды pCDNA3PSA с помощью ПЦР с использованием праймеров 5-PSA-Blunt(5'-GTGGGAGGCTGGGAGTGC-3') и 3-PSA-Blunt(5'-GGGGTTGGCCACGATGGT-S'). ПЦР проводят в циклере Thermal Cycler 60 (Biometra, Göttingen, Germany) в течение 30 циклов при 94°C в течение 1 мин, 56°C в течение 1 мин и 72°C в течение 2 мин. Затем продукт ДНК 0,7 т.п.н. клонируют в сайт SrfI pMKhly-CtxB. Полученную в результате плазмиду pMKhly-CtxB-PSA проверяют с помощью рестрикционного анализа и секвенирования.

1E Экспрессия и секреция слитых белков в различных бактериальных штаммах

30 Используя стандартные способы электропорации плазмидой pMKhly-CtxB-PSA трансформируют электрокомпетентные бактериальные штаммы. Устойчивые к канамицину отдельные колонии снимают и выращивают в среде ВНИ (Beckton Dickinson, USA: телячий головной мозг, экстракт из 200 г, 6,0 г/л; бычье сердце, экстракт из 250 г, 9,8 г/л; протеозопептон 10,0 г/л; хлорид натрия 5,0 г/л;

35 декстроза 2,0 г/л; динатрийфосфат 2,5 г/л) до густоты 1×10^9 клеток/мл. После выращивания 20 мл культуры центрифугируют в течение 30 мин при 4000 об/мин (3000 g) в центрифуге Heraeus при 4°C. 18 мл супернатанта переносят в свежую пробирку. Затем добавляют 1,8 мл ТСА (трихлоруксусной кислоты,

40 Applichem, Germany), жидкость перемешивают и инкубируют в течение по меньшей мере 1 часа на льду. После инкубирования суспензию центрифугируют в течение 30 мин при 4000 об/мин (3000 g) в центрифуге Heraeus при 4°C. Супернатант сливают с осадка и осадок промывают 1 мл ацетона р.а. (чистого для анализа) (Applichem, Germany). Осадок центрифугируют в течение 10 минут при 4000 об/мин (3000 g) в центрифуге Heraeus при 4°C. Осадок сушат на воздухе и помещают в 150 мкл 5х буфера Леммли (70 мМ Трис-HCl, pH 6,8, 40% (об./об.) глицерина, 3% (об./об.) додецил сульфата натрия, 5% (об./об.) 2-меркаптоэтанол и 0,05% (масс./об.) бромфенолового синего) с добавлением или без добавления β -меркаптоэтанол (см.

45 статью Laemmli, 1970). Для каждой дорожки при SDS PAGE (электрофорез в полиакриламидном геле с использованием додецилсульфата натрия) используют 20 мкл раствора. Разделенные белки электрофоретически переносят (вестерн-блот) на нитроцеллюлозную мембрану Hybond ECL (Amersham-Pharmacia, Little Chalfont, UK) и

блокируют в течение ночи PBS (хлорид калия 0,20 г/л, дигидрофосфат калия 0,20 г/л, хлорид натрия 8,00 г/л, дигидрофосфат динатрий безводный 1,15 г/л), содержащим 1% BSA (бычий сывороточный альбумин). Мембрану промывают в PBS-Твин 0,05%, инкубируют с поликлональным кроличьим антителом к PSA (1:750, DAKO, Denmark), антителом к CtxB (1:1000, Zytomed, Berlin, Germany) или антителом к HlyAs (см. статью Gentshev et al., 1996)) и затем инкубируют с HRP (пероксида хрена)-связанным IgG к кролику (1/2000; Dianova, Hamburg, Germany) в течение 1 часа. Вестерн-блот проявляют с помощью набора с усиленной флуоресценцией (GE Healthcare Life Science, Germany).

На фигуре 11 представлена функциональная экспрессия и секреция слитых белков PSA-CtxB в ряде бактериальных штаммов, включая *Escherichia coli* spp., *Salmonella dublin*, *Citrobacter* spp, *Salmonella typhi* Ty21a, *Salmonella typhimurium* spp, *Erwinia* spp и *Shigella flexneri* spp.

Штамм *Salmonella typhi* Ty21a, экспрессирующий и секретирующий слитый белок PSA-CtxB депонирован в Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур (DSMZ) под номером DSM 19244.

Пример 2: Иммунный ответ и защита от прививания опухолевых клеток у мышей, иммунизированных штаммами *Salmonella*, секретирующими слитые белки опухолевых антигенов и CtxB или CtxB в виде монокомпонента

Посредством следующих экспериментов повышенная защитная эффективность секретируемых слитых белков опухолевых антигенов и белковых токсинов продемонстрирована на модели опухолей у животных. Для данной модели штамм *Salmonella typhimurium* aroA (SL7207) pMKhly-CtxB-PSA, экспрессирующий и секретирующий слитый белок CtxB-PSA сравнивают с другими контрольными штаммами.

2А Способы иммунизации

Мышей DBA/2 иммунизируют три раза с интервалом 3 недели. Для иммунизации бактериями животных предварительно лечат введением 50 мкл 7% NaHCO₃ внутрижелудочно с целью повышения внутрижелудочного pH. Через 5-10 минут после предварительного лечения вводят 5×10⁸ живых нечувствительных к канамицину бактерий в объеме 100 мкл PBS внутрижелудочно. В качестве контроля мышей иммунизируют внутримышечно голый (депротеинизированной) плазмидной ДНК, кодирующей PSA (pcДНК-PSA), как описано в статье Fensterle et al., 2005.

2В Т-клеточные ответы

Через семь дней после последней иммунизации спленоциты иммунизированных мышей получают, как опубликовано ранее (см. статью Fensterle et al., 1999), пропусканием селезенки через сетку с последующим лизисом эритроцитов.

Анализ ELISPOT для детекции PSA-специфических Т-клеток CD⁸⁺ проводят согласно способу, опубликованному в статье Fensterle et al., 1999. Вкратце, для анализа ex vivo PSA-специфических Т-клеток CD⁸⁺ 96-луночные нитроцеллюлозные планшеты (Millititer HA; Millipore, Bedford, MA) покрывают 5 мкг/мл моноклонального антитела (mAb) к мышинному ИФН-γ R4 (PharMingen) в 100 мкл карбонатного буфера (см. статью Fensterle et al., 1999), pH 9,6. После инкубирования в течение ночи при 4°C и блокирования 1% BSA в PBS добавляют 1×10⁵ спленоцитов, полученных от вакцинированных мышей в 100 мкл RP10 (см. статью Fensterle et al., 1999)/лунку.

Для анализа ответа Т-клеток CD⁸⁺ используют экспрессирующий PSA клон клеток

P815 PPSA 24; вкратце, данный клон экспрессирует PSA полной длины посредством промотора CMV, кодируемый плазмидой pCDNA3 (см. статью Fensterle et al., 2005). После инкубирования в течение 20-22 ч при 37°C, 5% CO₂ в присутствии 30 ед./мл ИЛ-2 планшеты промывают и инкубируют в течение дополнительных 2 ч со 100 мкл биотинилированного mAb XMB1.2 к мышиному ИФН-γ (0,25 мкг/мл, PharMingen). Планшеты промывают и инкубируют в течение 1 ч при 37°C в присутствии 100 мкл разведения 1/20000 связанного с щелочной фосфатазой стрептавидина (PharMingen). Пятна визуализируют добавлением 50 мкл готового к применению

субстрата BCIP/NBT (Sigma, St. Louis, MO), растворенного в воде. Пятна подсчитывают под препаративным микроскопом при 3-кратном увеличении.

Частоту пептид-специфических Т-клеток (CTL) выражают как число ИФН-γ-секретирующих клеток/10⁵ спленоцитов. Для анализа ответов Т-клеток после повторной стимуляции 2,5×10⁷ спленоцитов повторно стимулируют 2×10⁶ облученных экспрессирующих PSA клеток P815 (см. статью Fensterle et al., 2005) в среде RP10 (см. статью Fensterle et al., 1999) в присутствии 60 ед./мл рекомбинантного ИЛ-2 в течение 5 дней. Анализ ELISPOT проводят, как описано выше, используя различные количества повторно стимулированных клеток (10⁵, 3×10⁴, 10⁴ или 3×10³/лунку), смешанных с 4×10⁵ фидерных клеток (= свежеполученных спленоцитов от непримированных (наивных) мышей DBA/2) и 10⁵ клеток PPSA24.

Индукция клеточного иммунного ответа, особенно цитотоксических Т-клеток CD⁸⁺, играет важную роль в плане эффективности противоопухолевой терапии (см. статьи Boon et al., 2006; Rosenberg, 2001). Вследствие этого сначала тестируют эффективность рекомбинантного бактериального штамма *Salmonella typhimurium* (SL7207), несущего вектор экспрессии pMKhly-CtxB-PSA, в индукции PSA-специфического иммунного ответа Т-клеток CD⁸⁺.

Для этой цели 64 самок мышей DBA-2 в возрасте 10-14 недель иммунизируют перорально рекомбинантным SL7207/pMKhly-CtxB (n=10), SL7207/pMKhly-CtxB-PSA (n=10), SL7207/pMKhly-PSA (n=10), SL7207/pMKhly-PSA/CxtB (n=10), SL7207/pMKhly1 (n=7) и голый pсДНК3-PSA (n=10) в качестве положительного контроля, как описано в данном контексте.

На фигуре 12 представлены данные ELISPOT, показывающие, что иммунизированные ДНК мыши демонстрируют выраженные ответы Т-клеток CD⁸⁺. После повторной стимуляции явные иммунные ответы определяют у животных, вакцинированных *Salmonella*, секретирующей белок PSA, слитый с CtxB, но не штаммами, секретирующими PSA в виде монокомпонента или отдельно PSA и CtxB. Интересно, что животные, вакцинированные *Salmonella*, секретирующей токсин CtxB в виде монокомпонента, также проявляют существенные иммунные ответы после повторной стимуляции. Данные ответы наиболее вероятно обусловлены НК-клетками или другими клетками врожденной иммунной системы, которая неспецифически распознает клеточную линию-мишень. Следовательно, на основании данных по секретируемому CtxB в виде монокомпонента можно заключить, что иммунный ответ, наблюдаемый для секретируемого слитого белка CtxB-PSA (секретирующие ИФН-γ спленоциты) состоит из ответа Т-клеток CD⁸⁺, а также выраженного ответа врожденной иммунной системы (наиболее вероятно, НК-клеток).

2С Защита от прививания опухолевых клеток

Для анализа защитной способности иммунизации 6-7 мышей/группу

иммунизируют согласно вышеописанной схеме. Через три недели после третьей иммунизации мышам прививают PPSA 24 (см. выше) путем подкожной инъекции 1×10^6 клеток с каждого бока выбритой кожи живота. Мышей мониторируют в течение 14 дней на предмет появления опухолей и оценивают объем опухолей путем измерения самого большого (a) и самого маленького (b) диаметра опухоли. Объем опухоли рассчитывают как тело, образуемое вращением эллипса, используя следующую формулу:

$$V = \frac{\pi}{6} \times a \times b^2, a > b$$

Анализируют значимость результатов посредством одностороннего ANOVA и повторного теста множественного сравнения Даннетта с использованием пакета программ Graph Pad Prism. Повторный тест проводят только в случае, когда ANOVA показывает значимость результатов.

На фигуре 13 представляют результаты как среднее $\pm$ SD (стандартная ошибка). В день 6, 9, 12 и 14 наблюдают существенные защитные эффекты. Как ожидают, вакцинация голый ДНК включает в качестве контроля мышей, полностью защищенных от роста опухолей. Однако вакцинация голый ДНК показывает самое большее среднюю эффективность у человека. Что касается бактериальных конструкций, то вакцинный штамм SL7207/pMKhly-CtxB-PSA (экспрессирующий и секретирующий слитый белок CtxB-PSA) оказывается наиболее эффективным. Он существенно уменьшает объем опухоли в 9, 12 и 14 после прививания опухоли. Известно также, что штамм SL7207/pMKhly-CtxB уменьшает рост опухоли на величины, сравнимые с SL7207/pMKhly-CtxB-PSA, в день 14. Хотя недостоверно, данный задерживающий эффект хорошо согласуется с клеточным ответом, который измеряют с помощью анализа ELISPOT. Более того, штамм SL7207/pMKhly-PSA также дает значительную защиту в день 14, что показывает, что данный штамм также индуцирует Т-клеточный ответ, который ниже порога определения. Напротив, штамм SL7207/pMKhly-PSA/CxtB не индуцирует соответствующий эффект и остается в том же диапазоне, что SL7207/pMKhly1 как монокомпонент.

Пример 3: Экспрессия и секреция слитого белка онкоген-токсин в *S. typhi* Ty21a

Аналогично примеру 1 используют другой опухолевый антиген, домен киназы онкогена B-Raf V600E с делецией 10 aa (аминокислот) в домене киназы (домен киназы BRaf V600E киназа dead (KD) или, сокращенно, BRaf* KD, более коротко BKD). Слитый белок данного онкогена и компонентов белкового токсина, в данном случае CtxB, в качестве адъюванта, конструируют, как описано в данном контексте. Экспрессию и секрецию демонстрируют на человеческом вакцинном штамме *S. typhi* Ty21a. Молекулярное клонирование основано на использовании плазмиды/вектора экспрессии pMOhlyl, который описан ранее (см. статьи Gentschev et al., 2005; Gentshev et al., 1996), и способ клонирования аналогичен описанному в примере 1 данной заявки. Полученный в результате вектор называют pMBKDC.

Последовательность слитого белка приведена на фигуре 10.

На фигуре 17 показана экспрессия и секреция слитого белка с использованием вектора pMBKDC, электропорированного в штамм *Salmonella typhi* Ty21a и другие бактериальные штаммы.

Штамм *Salmonella typhi* Ty21a, экспрессирующий и секретирующий слитый белок BKD-CtxB, депонирован в Немецкой коллекции Микроорганизмов и клеточных культур (DSMZ) под номером DSM 19245.

Пример 4: Сравнение слитой конструкции OVA-CtxB с другими генетически

кодируемыми иммунологическими адъювантами

Для сравнения иммунологической эффективности слитых белков токсин-антиген, секретируемых живыми вакцинами, конструируют слитый белок, включающий широко используемый для иммунологических исследований антиген, куриный овальбумин (OVA), и CtxB.

Смысловый праймер Nsil-OVA-прямой 5' - CAT GTA TGC ATT AGC CAT GGT ATA CCT GG-3' и антисмысловый праймер Nsil-OVA-обратный 5'-TTT TTT ATG CAT AAG GG AAA CAC CAC ATC TGC C-3' используют для амплификации посредством ПЦР фрагмента ДНК из 1033 пар оснований, представляющий собой ген ova (NM205152). После очистки с помощью набора QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Germany) и разрезания рестрикционным ферментом Nsil фрагмент ДНК, несущий целый ген ova без N-концевой сигнальной последовательности, вводят в единственный сайт Nsil экспортирующего вектора pMKhly1. Полученную в результате плазмиду pMKhly-Ova выделяют из E. coli DH5α (Life Technologies), анализируют и секвенируют.

Смысловый праймер 5'cfxB Nsil (5'-GCATATGCAATGCATCACCTCAAAATATTACTGAT-3') и антисмысловый праймер 3' ctxB SrfI Nsil (5'-GGCTTTTATATCTTATGCATGCCC GGGCATTGCGGCAATCGC-3') (сайт SrfI выделен жирным шрифтом) используют для амплификации с помощью ПЦР фрагмента ДНК из ~300 пар оснований, представляющий собой ген ctxB из V. cholerae El tor. После очистки с помощью набора QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Germany) и разрезания рестрикционным ферментом Nsil фрагмент ДНК, несущий целый ген ctxB без N-концевой сигнальной последовательности, вводят в единственный сайт Nsil экспортирующего вектора pMKhly1. Полученную в результате плазмиду pMKhly-CtxB выделяют из E. coli DH5α (Life Technologies), анализируют и секвенируют. Человеческий ген ova амплифицируют из плазмиды pCl-OVA с помощью ПЦР с использованием праймеров 5-OVA-SrfI GCC ATC ATG TCA GCT CTA и 3-OVA-SrfI AGG GGA AAC ACA TCT GCC. ПЦР проводят в цикле Thermal Cycler 60 (Biometa, Göttingen, Germany) в течение 30 циклов 1 мин при 94°C, 1 мин при 49°C и 2 мин 30 сек при 72°C. Затем продукт ДНК 1,1 т.п.н. клонируют в сайт SrfI pMKhly-CtxB. Полученную в результате плазмиду pMKhly-CtxB-OVA проверяют с помощью рестрикционного анализа и секвенирования.

Способность данного слитого белка вызывать иммунные ответы Th1 сравнивают со способностью кодируемого вектором pMKhly OVA в виде монокомпонента в комбинации с плазмидами, доставляющими ДНК (кодирующими белки под контролем эукариотического промотора), кодирующими интерфероны (ИФН-γ), интерлейкины (ИЛ-12) и хемокины (IP-10).

Способы иммунизации и анализ ELISPOT осуществляют, как описано выше. Вкратце, мышей C57BL/6 иммунизируют перорально три раза различными штаммами. Через 7 дней после конечной иммунизации спленциты удаляют, повторно стимулируют в течение 5 дней и исследуют с помощью анализа ELISPOT.

Для повторной стимуляции спленцитов используют клетки, обработанные в импульсном режиме пептидом SIINFELK (буквы означают аминокислоты), эпитопом овальбумина H-2^b с рестрикцией MHC-1.

На фигуре 14 показана повышенная эффективность слитого белка, включающего куриный овальбумин (OVA) и CtxB, в индукции OVA-специфических ответов Т-клеток CD⁸⁺ и потенциальных ответов врожденной иммунной системы по сравнению с конструкциями, совместно доставляющими ИФН-γ или IP-10. Он проявляет эффективность, близкую к эффективности штамма с конструкцией совместной

доставки ИЛ-12.

Пример 5: Экспрессия и секреция вирусных антигенов

Пригодность микроорганизмов, соответствующих изобретению, для экспрессии и секреции какого-либо (неопухолевого) антигена демонстрируют посредством экспрессии белка гемагглютинина Н1 вируса куриного гриппа H5N1, слитого с CtxB в ветеринарном вакцинном штамме *Salmonella typhimurium* VacT.

Смысловый праймер 5'-НА-G: 5'-ATC TGT CAA ATG GAG AAA-3' и антисмысловый праймер 3-НА12С: 5'-ТАС ТСС АСТ ТАТ TTC CTC TCT-3' используют в ПЦР, амплифицируя фрагмент ДНК, кодирующий Н5 без С-концевого мембранного домена (Н12С). Затем продукт ПЦР клонируют в сайт SrfI pMKhly-CtxB. Полученную в результате плазмиду pMKhly-CtxB-Н12С исследуют посредством рестрикционного анализа и секвенирования. Штамм *S. typhimurium* VacT/pMKhly-CtxB-Н12С эффективно экспрессирует и секретирует гибридный белок Н5, как показано с помощью иммуноблоттинга с поликлональными антителами, образующимися к CtxB и НlyА (см. фиг.2). Количество секретируемого Н5 составляет 2-3 мкг белка/мл супернатанта в условиях эксперимента.

Бактерии выращивают в среде ВНИ до густоты 1×10^9 клеток/мл. 20 мл культуры центрифугируют в течение 30 мин при 4000 об/мин (3000 g) и 4°C в центрифуге Heraeus. 18 мл супернатанта переносят в свежую пробирку. Затем добавляют 1,8 мл ТСА (трихлоруксусной кислоты, Applichem, Germany), жидкость перемешивают и инкубируют на льду в течение по меньшей мере 1 часа. После инкубирования суспензию центрифугируют в течение 30 мин при 4000 об/мин (3000 g) в центрифуге Heraeus при 4°C. Супернатант сливают с осадка и осадок промывают 1 мл ацетона р.а. (чистого для анализа) (Applichem, Germany); осадок центрифугируют в течение 10 минут при 4000 об/мин (3000 g) при 4°C в центрифуге Heraeus. Осадок сушат на воздухе и помещают в 150 мкл 5х буфера Леммли. Для каждой дорожки при SDS PAGE используют 20 мкл раствора. Разделенные белки электрофоретически переносят (вестерн-блот) на нитроцеллюлозную мембрану Hybond ECL (Amersham-Pharmacia, Little Chalfont, UK) и блокируют в течение ночи PBS, содержащим 1% BSA. Мембрану промывают в PBS-Твин 0,05%, инкубируют с поликлональным кроличьим антителом к CtxB (1:1000, Zytomed, Berlin, Germany) или антителом к НlyAs (см. статью Gentshev et al., 1996)) и затем инкубируют с HRP-связанным IgG к кролику (1/2000; Dianova, Hamburg, Germany) в течение 1 часа. Вестерн-блот проводят с использованием набора с усиленной флуоресценцией (GE Healthcare Life Science, Germany).

На фигуре 15 представлена эффективная экспрессия и функциональная секреция слитого белка НА12С-CtxB в ветеринарном вакцинном штамме *Salmonella typhimurium* VacT.

Пример 6: Экспрессия и секреция слитых белков токсинных адъювантов и опухолевых антигенов посредством систем секреции типа III

Некоторые грамотрицательные бактерии несут системы секреции типа III, которые можно использовать для секреции антигенов. Как правило, данные системы можно использовать для непосредственной инъекции гетерологичных антигенов в клетки. В данном примере токсинный компонент *Yersinia*, который служит в качестве сигнала секреции (YopE), генетически слит с фрагментом термолабильной субъединицы энтеротоксина В (LT-B), служащим в качестве адъюванта, и опухолевым антигеном PSA. Данная конструкция должна экспрессироваться в подходящих, предпочтительно аттенюированных штаммах *Yersinia*, которые

приводят к секреции слитого белка путем эндогенного механизма секреции типа III с помощью сигнальной последовательности YopE.

В данном примере генетическое слияние YopE18-LT-B-PSA клонируют в сайт EcoRI плазмиды раCYC1 84 для использования конструкции с такой же ориентацией, в которой используют ген, с получением продукта, экспрессируемого плазмидой, кодирующей промотор cat (<http://www.fermentas.com/techinfo/nucleicacids/mappacyc184.htm>). Для повышенного уровня экспрессии можно использовать любой подходящий промотор.

В дальнейшем иллюстрируют способ клонирования. Хромосомную ДНК из *E. coli*, включающую субъединицу В термостабильного энтеротоксина, или вектор, включающий данную последовательность (GenBank регистрационный номер AF242418), амплифицируют, используя следующие праймеры в реакции ПЦР:

Eco-yopE18-f (включающий сайт EcoRI site + сигнальную последовательность YopE18):

5'-

CTGAATTC

ATGAAAATATCATCATTTATTTCTACATCACTGCCCCCTGCCGGCATCAGTGTCAATAAAGTAAAATGTTATGTTTTAT3' (5'-участок показан черным: сайт EcoRI+3 основания 5', показан красным: последовательность, кодирующая сигнал для секреции типа III белка YopE (aa 1-18), GenBank регистрационный No M92066; участок, выделенный курсивом: участок гомологии гена LT-B (GB регистрационный No AF242418), основания 4-28).

Фосфорилированный обратный праймер LT-B-r: 5'GTTTTCCATACTGATTGCCGCAATTGAATTGG-3' (обратная цепь 372-341 GB AF242418).

Параллельно последовательность PSA, как описано в данной заявке, из вектора рМКCtxB-PSA амплифицируют, используя следующие праймеры: фосфорилированный прямой праймер psa-f: 5'-GTGGGAGGCTGGGAGTGCGAG-3', обратный праймер psa-eco-r: 5'-CCTGAATTCTTAGACGTGATACCTTGAAGCAC (5', показано черным: сайт EcoRI+3 основания 5', показаны синим: стоп-кодон, показан черным: 3'-участок последовательности PSA, данная заявка).

Затем два фрагмента лигируют с помощью ДНК-лигазы в подходящих условиях. После лигирования новый фрагмент амплифицируют во второй реакции ПЦР, используя праймеры Eco-yopE18-f и PSA-Eco-R, описанные выше.

Полученный в результате фрагмент очищают, используя подходящий набор очистки для ПЦР, с целью удаления буфера и олигонуклеотидов и затем разрезают ферментом EcoRI в подходящих условиях реакции. Полученный в результате фрагмент из 1040 пар оснований очищают, используя электрофорез в агарозном геле, и лигируют в разрезанный EcoRI вектор раCYC184. После секвенирования выбирают устойчивые к тетрациклину, чувствительные к см (канамицину) клоны, которые имеют правильную последовательность, интегрированную в той ориентации, что ген см, и трансформируют подходящий штамм *Yersinia*, используя электропорацию. Данный вакцинный штамм будет секретировать слияние LT-B-PSA посредством эндогенной системы секреции типа III.

Пример 7: Экспрессия и секреция слияний токсин-антиген в грамположительных бактериях

Грамположительные и отрицательные бактерии имеют различные предварительные условия для секреции. Грамотрицательные бактерии имеют две

мембраны и, вследствие этого, механизм секреции в дополнение к сигналам секреции является необходимым для полной секреции. В случае грамположительных бактерий достаточно сигнальной последовательности секреции.

В данном примере описана система для секреции слияния столбнячный токсин-PSA в *Listeria* с использованием сигнала секреции *prb0*. На первой стадии вектор pUC18(PS)actAOVATinA (см. статью Loeffler et al., 2006) разрезают, используя NsiI, и затем обрабатывают, 3'-5' экзонуклеазой в подходящих условиях. Наконец, фрагмент очищают электрофорезом на агарозном геле.

Параллельно фрагмент C столбнячного токсина (GenBank регистрационный номер No. M 12739) амплифицируют из подходящего источника, например, геномной ДНК из штамма *Clostridium tetani*, с использованием следующих фосфорилированных праймеров:

tetC прямой: 5'-ТААААТСТГГАТТГТТГГГТТГ-3', где подчеркнутое дополнительное основание введено, чтобы обеспечить правильную рамку слияния.
tetC обратный: 5'-АТСАТТТГТССАТССТТКАТСТГ-3'.

Фрагмент BRAF KD амплифицируют из плазмиды pMO BKDC, описанной в данной заявке, с использованием фосфорилированных праймеров:

br прямой: 5'-GATTGGGAGATTCCTGATG-3'
br обратный: 5'-CCCGTGG ACAGG AAACGCACC-3'.

Оба фрагмента очищают с использованием подходящего набора для ПЦР-очистки и затем лигируют с помощью ДНК-лигазы в подходящих условиях. После лигирования фрагмент очищают снова, используя подходящий набор для ПЦР-очистки, и амплифицируют, используя tetC прямой и br обратный праймер. После амплификации полученный в результате фрагмент из 2280 пар оснований очищают электрофорезом на агарозном геле и лигируют в очищенный фрагмент 3'-5' экзонуклеазы NsiI pUC18(PS)actAOVATinA. После лигирования и трансформации *E. coli* отбирают клон, несущий фрагмент в рамке считывания. Затем плазмиду разрезают, используя PstI и SacI, и фрагмент из 2837 пар оснований очищают, используя гель-электрофорез, и лигируют в соответствующим образом разрезанный PstI и SacI и очищают вектор pSP118 (см. статью Loeffler et al., 2006). Полученным в результате вектором pSP118-act-TetC-BRaf*KD трансформируют штамм *Listeria*, несущий делецию *trpS*, например *Listeria monocytogenes* у *trpS* у *aroA/B* (см. статью Loeffler et al., 2006). В данном исследовании плазмиду стабилизируют с помощью *trpS* на основе плазмиды ("Сбалансированная летальная система"), и плазида кодирует фаговый лизин, что приводит к внутриклеточному лизису штамма. Кассета act-TetC-BRaf*KD экспрессируют главным образом в эукариотических клетках-хозяевах под контролем промотора actA, в которых происходит некоторое внеклеточное вытекание (Loeffler et al., 2006). Сигнальная последовательность кассеты actA приводит к секреции слитого белка TetC-BRaf*KD.

Пример 8: Эукариотические клетки, секретирующие слияния токсин-антиген

В данном примере конструируют эукариотическую клеточную линию, например, опухолевую клеточную линию, которая секретирует слитый белок CtxB-PSA. Для этой цели используют универсальный сигнал секреции (US 6733997), который в принципе обеспечивает секрецию соответствующей экспрессирующей кассеты в клетках различной природы, включая клетки млекопитающих, дрожжи и прокариотические клетки.

На первом этапе слияние CtxB-BRaf* KD амплифицируют из плазмиды pMO BKDC (см. данную заявку), используя следующие праймеры:

СВ-прямой: 5'-atcGGATCCTCAAAATATTACTGATTTGTGTGC-3' (строчные буквы: спейсер подчеркнут: сайт BamHI, прописные буквы: CtxB 5')

СВ-обратный: 5'-tagGGATCCTTAGTGACAGGAAACGCACCATATCC-3' (строчные буквы: спейсер подчеркнут: сайт BamHI, курсив: стоп-кодон, прописные буквы: BRaf* KD 3'). Затем продукт ПЦР очищают, используя подходящий набор для ПЦР-очистки, и потом частично разрезают (фрагмент включает внутренний сайт BamHI) с помощью BamHI. Фрагмент частичного разрезания из 1231 пары оснований выделяют с помощью электрофореза на агарозном геле и затем лигируют в разрезанную BamHI и гель-очищенную плазмиду pVtgEGFP (патентная заявка США 6733997). Потом отбирают клон, несущий в ориентации рамки считывания с Vtgss, и называют pVtgCtxBRAf. Данной плазмидой можно трансформировать посредством электропорации эукариотическую клеточную линию, которую можно выбрать с помощью селекционной кассеты kan/neo. Клеточные линии могут представлять собой стабилизированные клеточные линии, подобные раковым клеточным линиям, предназначенным для использования в качестве гетерологичной противораковой вакцины, или опухолевым клеткам, выделенным у пациента, предназначенным для использования в качестве аутологичных противораковых вакцин. В любом случае сигнал секреции Vtgss, кодируемый вектором pVtgEGFP, генетически слитый с CtxB-BRaf*KD, будет приводить в результате к секреции слитого белка.

Используя аналогичный подход, слитые белки можно также экспрессировать в дрожжах. В качестве примера демонстрируют модифицированную стратегию клонирования, как показано на фиг.11 заявки US 6733997. На первом этапе кассету, включающую слияние Vtgss-CtxB-BRaf*KD из вышеописанной плазмиды pVtgCtxBRAf, вырезают с помощью EagI и Eco47III и вводят в вектор pBSPGK (см. US 6733997, фиг.11). Затем полученный в результате вектор разрезают SacI и HindIII и фрагмент, включающий элемент PGK и слияние Vtgss-CtxB-BRaf*KD интегрируют в соответствующий участок вектора pYEX-S1 аналогично описанию заявки US 6733997 (см. фиг.11). Полученной в результате плазмидой можно трансформировать путем электропорации штаммы дрожжей, такие как *Saccharomyces cerevisiae*. Дрожжи будут экспрессировать и секретировать слитый белок и могут быть использованы для целей вакцинации.

Сокращения

ABC -	АТФ-связывающая кассета
AIDA -	адгезин, участвующий в диффузной адгезии
APC -	антиген-презентирующая клетка
agoA -	ген agoA
AT -	α -токсин
АТФ -	аденозинтрифосфат
B-Raf KD -	домен киназы B-Raf
BSA -	бычий сывороточный альбумин
Cag A -	главный ассоциированный с заболеванием белок вирулентности <i>Helicobacter pylori</i>
CPE -	энтеротоксин <i>Clostridium perfringens</i>
CrG -	последовательности ДНК, содержащие гипометилированные иммуностимулирующие последовательности ДНК, включающие мотивы CrG
CT/Ctx -	холерный токсин
CTB/CtxB -	субъединица В холерного токсина
CTL -	цитотоксические Т-клетки CD ⁸⁺ (Т-клетки киллеры)
CMV -	цитомегаловирус
ДНК -	дезоксирибонуклеиновая кислота

	ds -	двухцепочечная
	DT/Dtx -	дифтерийный токсин
	E. coli -	Escherichia coli
	EBV -	вирус Эпштейна-Барр
5	рецептор GM-1 -	рецептор моносиалоганглиозидазы 1
	HA -	гемагглютинин
	HCV -	вирус гепатита С
	ВИЧ -	вирус иммунодефицита человека
	Hly -	гемолизин
10	HPV -	вирус папилломы человека
	HT -	геморрагический токсин
	i.d. -	внутрикожно
	i.m. -	внутримышечный
	i.p.-	внутрибрюшинно
15	ИФН -	интерферон
	IgA -	иммуноглобулин изотипа А
	IgG -	иммуноглобулин изотипа G
	ИЛ -	интерлейкин
	KD -	киназа dead
20	LPS -	липополисахарид
	LT -	термолабильный энтеротоксин E. coli
	LT -	летальный токсин
	LTB -	субъединица В термолабильного энтеротоксина E. coli
	mAb -	моноклональное антитело
	MHC -	главный комплекс гистосовместимости
25	МК-клетка -	натуральная клетка-киллер
	МКТ-клетка -	Т-клетка натуральный киллер
	PAGE -	электрофорез в полиакриламидном геле
	PBS -	буференный фосфатом солевой раствор
	ПЦР -	полимеразная цепная реакция
30	PE -	экзотоксин A Pseudomonas
	PSA -	простата-специфический антиген
	PT/Ptx -	токсин коклюша
	PHK -	рибонуклеиновая кислота
	s.c. -	подкожный
35	SDS -	додецилсульфат натрия
	Sec -	главный секреторный (Sec) путь
	Ss -	одноцепочечный
	ST -	термостабильный энтеротоксин E. coli
	ST/Stx -	шига-токсин
	STB/StxB -	субъединица В шига-токсина
40	T3SS -	система секреции типа III
	Tat -	двойная транслокация аргинина
	TCA -	трихлоруксусная кислота
	Th1 (клетка) -	воспалительные Т-клетки CD4 ⁺
	Th2 (клетка) -	Т-клетки-хелперы CD4 ⁺
45	TSST-1 -	токсин синдрома токсического шока
	TT -	столбнячный токсин
	VT -	Vero-токсин

Библиография

- 50 Agren, L C, Ekman, L, Lowenadler, B., Nedrud, J. G., and Lycke, N. Y. (1999).
Adjuvantcity of the cholera toxin A1-based gene fusion protein, CTA1-DD, is critically dependent on the ADP-ribosyltransferase and Ig-binding activity (Адьювантность слитого белка на основе гена холерного токсина A1, CTA1-DD, в существенной степени

зависит от активности АДФ-рибозилтрансферазы и Ig-связывающей активности. J Immunol 162, 2432-2440.

Anderson, R.J., Pasetti, M.F., Sztein, M.B., Levine, M.M., and Noriega, F.R. (2000). Delta guaBA attenuated *Shigella flexneri* 2a strain CVD 1204 as a *Shigella* vaccine and as a live mucosal delivery system for fragment C of tetanus toxin. (Дельта guaBA аттенюированный штамм *Shigella flexneri* 2a CVD 1204 как вакцина против *Shigella* и как живая система доставки через слизистые для фрагмента C столбнячного токсина). Vaccine 18, 2193-2202.

Austin, E.A., Graves, J.F., Hite, L.A., Parker, C.T., and Schnaitman, C.A. (1990). Genetic analysis of lipopolysaccharide core biosynthesis by *Escherichia coli* K-12: insertion mutagenesis of the rfa locus. (Генетический анализ биосинтеза липополисахаридного ядра *Escherichia coli* K-12: инсерционный мутагенез локуса rfa). J Bacteriol 172, 5312-5325.

Balsalobre, C., Silvan, J.M., Berglund, S., Mizunoe, Y., UhNn, B.E., and Wai, S.N. (2006). Release of the type I secreted alpha-haemolysin via outer membrane vesicles from *Escherichia coli*. (Высвобождение секретируемого α -гемолизина типа I через пузырьки наружной мембраны из *Escherichia coli*). Mol Microbiol 59, 99-112.

Barry, E. M., Gomez-Duarte, O., Chatfield, S., Rappuoli, R., Pizza, M., Losonsky, G., Galen, J., and Levine, M.M. (1996). Expression and immunogenicity of pertussis toxin 81 subunit-tetanus toxin fragment C fusions in *Salmonella typhi* vaccine strain CVD 908. (Экспрессия и иммуногенность слияний субъединица S1 токсина коклюша-фрагмента C столбнячного токсина). Infect Immun 64, 4172-4181.

Becerra, J.C., Arthur, J.F., Landucci, G.R., Forthal, D.N. and Theuer, C.P. (2003). CD⁸⁺ T-cell mediated tumor protection by *Pseudomonas* exotoxin fused to ovalbumin in C57BL/6mice. (Опосредованная Т-клетками CD⁸⁺ противоопухолевая защита посредством экзотоксина *Pseudomonas*, слитого с овальбумином, у мышей C57BL/6). Surgery 133, 404-410.

Boon, T., Coulie, P. G., Van den Eynde, B. J., and van der Bruggen, P. (2006). Human T cell responses against melanoma. (Ответы человеческих Т-клеток в отношении меланомы). Annu Rev Immunol 24, 175-208.

Boyd, A.P., Ross, P.J., Conroy, H., Mahon, N., Lavelle, E.C., and Mills, K.H. (2005). Bordetella pertussis adenylate cyclase toxin modulates innate and adaptive immune responses: distinct roles for acylation and enzymatic activity in immunomodulation and cell death, (токсин аденилатциклаза Bordetella pertussis модулирует врожденный и адаптивный иммунный ответы: особая роль ацилирования и ферментной активности в иммуномодуляции и гибели клетки). J Immunol 175, 730-738.

Brassier, F., Weber-Levy, M., Mock, M., and Sirard, J.C. (2000). Protective antigen-mediated antibody response against a heterologous protein produced in vivo by *Bacillus anthracis*. (Защитный опосредованный антигеном ответ антител в отношении гетерологичного белка, продуцируемого in vivo *Bacillus anthracis*). Infect Immun 68, 5731-5734.

Bumann, D. (2001). Regulated antigen expression in live recombinant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium strongly affects colonization capabilities and specific CD4(+)-T-cell responses. (Регулируемая экспрессия антигена в живой рекомбинантной *Salmonella enterica* серовар Typhimurium сильно влияет на способности колонизации и специфические ответы Т-клеток CD4+). Infect Immun 69, 7493-7500.

Busby, S., and Ebright, R. H. (1994). Promoter structure, promoter recognition, and transcription activation in prokaryotes. (Структура промотора, распознавание

промоторов и активация транскрипции у прокариот). Cell 79, 743-746.

Butterton, J.R., Beattie, D.T., Gardel, C. L., Carroll, P.A., Hyman, T., Killeen, K.P., Mekalanos, J.J., and Calderwood, S.B. (1995). Heterologous antigen expression in *Vibrio cholerae* vector strains. (Экспрессия гетерологичного антигена в векторных штаммах *Vibrio cholerae*) Infect Immun 63, 2689-2696.

Byun, Y., Ohmura, M., Fujihashi, K., Yamamoto, S., McGhee, J. R., Uda, S., Kiyono, H., Takeda, Y., Kohsaka, T., and Yuki, Y. (2001). Nasal immunization with *E. coli* vero-toxin 1 (VT1)-B subunit and a nontoxic mutant of cholera toxin elicits serum neutralizing antibodies. (Назальная иммунизация В-субъединицей веро-токсина 1 (VT1) *E. coli* и нетоксичный мутант холерного токсина вызывает образование сывороточных нейтрализующих антител). Vaccine 19, 2061-2070.

Campos, J., Martinez, E., Marrero, K., Silva, Y., Rodriguez, B. L., Suzarte, E., Ledon, T., and Fando, R. (2003). Novel type of specialized transduction for CTX phi or its satellite phage RS1 mediated by filamentous phage VGJ phi in *Vibrio cholerae*. (Новый тип специализированной трансдукции для CTX phi или его сателлитного фара RS1, опосредованной филаментозным фагом VGJ phi в *Vibrio cholerae*) J Bacteriol 185, 7231-7240.

Cardenas, L, and Clements, J.D. (1992). Oral immunization using live attenuated *Salmonella* spp. as carriers of foreign antigens. (Пероральная иммунизация с использованием живой аттенюированной *Salmonella* spp. как носителя чужеродных антигенов). Clin Microbiol Rev 5, 328-342.

Cardenas, L, and Clements, J.D. (1993). Development of mucosal protection against the heat-stable enterotoxin (ST) of *Escherichia coli* by oral immunization with a genetic fusion delivered by a bacterial vector. (Развитие защиты слизистой от термостабильного энтеротоксина (ST) *Escherichia coli* путем пероральной иммунизации генетическим слиянием, доставляемым бактериальным вектором). Infect Immun 61, 4629-4636.

Chabalgoity, J.A., Harrison, J.A., Esteves, A., Demarco de Hormaeche, R., Ehrlich, R., Khan, C.M., and Hormaeche, C.E. (1997). Expression and immunogenicity of an *Echinococcus granulosus* fatty acid-binding protein in live attenuated *Salmonella* vaccine strains. (Экспрессия и иммуногенность связывающего жирные кислоты белка *Echinococcus granulosus* в живых аттенюированных вакцинных штаммах *Salmonella*). Infect Immun 65, 2402-2412.

Chabalgoity, J.A., Khan, C.M., Nash, A.A., and Hormaeche, C.E. (1996). A *Salmonella typhimurium* htrA live vaccine expressing multiple copies of a peptide comprising amino acids 8-23 of herpes simplex virus glycoprotein D as a genetic fusion to tetanus toxin fragment C protects mice from herpes simplex virus infection. (Живая вакцина на основе *Salmonella typhimurium* htrA, экспрессирующая множество копий пептида, содержащего аминокислоты 8-23 гликопротеина D вируса простого герпеса в виде генетического слияния с фрагментом С столбнячного токсина, защищает мышей от инфекции вируса простого герпеса). Mol Microbiol 19, 791-801.

Chabalgoity, J. A., Moreno, M., Carol, H., Dougan, G., and Hormaeche, C. E. (2000). *Salmonella typhimurium* as a basis for a live oral *Echinococcus granulosus* vaccine. (*Salmonella typhimurium* как основа для живой пероральной вакцины *Echinococcus granulosus*). Vaccine 19, 460-469.

Chabalgoity, J.A., Villareal-Ramos, B., Khan, C.M., Chatfield, S.N., de Hormaeche, R.D., and Hormaeche, C.E. (1995). Influence of preimmunization with tetanus toxoid on immune responses to tetanus toxin fragment C-guest antigen fusions in a *Salmonella* vaccine carrier. (Влияние предварительной иммунизации столбнячным токсинидом на иммунные

ответы в отношении слияний фрагмент С столбнячного токсина - чужеродный антиген и вакцинном носителе *Salmonella*). *Infect Immun* 63, 2564-2569.

Chacon, M.R., Londono, P., Dougan, G., and Selkirk, M.E. (1996). Heterologous expression of the cuticular-glutathione peroxidase of lymphatic filariae in an attenuated vaccine strain of *Salmonella typhimurium* abrogates H-2 restriction of specific antibody responses.

(Гетерологичная экспрессия кутикулярной глутатион-пероксидазы лимфатических фибрилл в аттенюированном вакцинном штамме *Salmonella typhimurium* отменяет H-2-рестрикцию ответов специфических антител). *Parasite Immunol* 18, 307-316.

Chen, I., Finn, T. M., Yanqing, L., Guoming, Q., Rappuoli, R., and Pizza, M. (1998). A recombinant live attenuated strain of *Vibrio cholerae* induces immunity against tetanus toxin and *Bordetella pertussis* tracheal colonization factor. (Рекомбинантный живой аттенюированный штамм *Vibrio cholerae* индуцирует иммунитет в отношении столбнячного токсина и трахеального фактора колонизации *Bordetella pertussis*).

Infect Immun 66, 1648-1653.

Cheng-hua, S., Cheng, C, Jing-sheng, Z., Jiezhi., L, and Qing-jun, M. (1995). Gene fusion of cholera toxin B subunit and HBV PreS2 epitope and the antigenicity of fusion protein.

(Слияние генов В-субъединицы холерного токсина и эпитопа HBV PreS2 и антигенность слитого белка). *Vaccine* 13, 933-937.

Clemens, J., Savarino, S., Abu-Elyazeed, R., Safwat, M., Rao, M., Wierzba, T., Svennerholm, A.M., Holmgren, J., Frenck, R., Park, E., and Naficy, A. (2004). Development of pathogenicity-driven definitions of outcomes for a field trial of a killed oral vaccine against enterotoxigenic *Escherichia coli* in Egypt: application of an evidence-based method.

(Разработка обусловливаемых патогенностью определений конечных итогов для полевых испытаний убитой пероральной вакцины против энтеротоксигенной *Escherichia coli* в Египте, применение метода на основе доказательств). *J Infect Dis* 189, 2299-2307.

Datsenko, K.A., and Wanner, B.L. (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. (Одностадийная инактивация хромосомных генов в *Escherichia coli* K-12 с использованием продуктов ПЦР). *Proc Natl Acad Sci USA* 97, 6640-6645.

Dietrich, G., Bubert, A., Gentschev, I., Sokolovic, Z., Simm, A., Catic, A., Kaufmann, S.H., Hess, J., Szalay, A.A., and Goebel, W. (1998). Delivery of antigen-encoding plasmid DNA into the cytosol of macrophages by attenuated suicide *Usteria monocytogenes*. (Доставка кодирующей антиген плазмидной ДНК в цитозоль макрофагов посредством аттенюированной суицидной *Usteria monocytogenes*). *Nat Biotechnol* 16, 181-185.

Dietrich, G., Viret, JF, and Gentschev, I. (2003). Haemolysin A and listeriolysin - two vaccine delivery tools for the induction of cell-mediated immunity. (Гемолизин А и листериолизин - два инструмента доставки вакцины для индукции опосредованного клетками иммунитета). *Int. J. Parasitol* 33, 495-505.

Dunn, G.P., Old, L.J., and Schreiber, R.D. (2004). The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. (Иммунобиология иммуновыживаемости и иммунокоррекции рака) *Immunity* 21, 137-148.

Dunstan, S.J., Simmons, C.P., and Strugnell, R.A. (2003). In vitro and in vivo stability of recombinant plasmids in a vaccine strain of *Salmonella enterica* var. *typhimurium*.

(Стабильность in vitro и in vivo рекомбинантных плазмид в вакцинном штамме *Salmonella enterica* var. *typhimurium*). *FEMS Immunol Med Microbiol* 37, 111-119.

Eriksson, A.M., Schon, K.M., and Lycke, N.Y. (2004). The cholera toxin-derived CTA1-DD vaccine adjuvant administered intranasally does not cause inflammation or accumulate in the

nervous tissues. (Вакцинный адъювант СТА1-DD, полученный из холерного токсина, вводимый интраназально, не вызывает воспаления или накопления в нервных тканях). *J Immunol* 173, 3310-3319.

5 Fath, M.J., Skvirsky, R.C, and Kolter, R. (1991). Functional complementation between bacterial MDR-like export systems: colicin V, alpha-hemolysin, and *Erwinia* protease. (Функциональная комплементация между бактериальными MDR-подобными системами экспорта: колицином V, α -гемолизином и протеазой *Erwinia*). *J Bacteriol* 173, 7549-7556.

10 Fensterle, J., Grode, L, Hess, J., and Kaufmann, S. H. E. (1999). Effective DNA vaccination against listeriosis by prime/boost inoculation with the gene gun. (Эффективная ДНК-вакцинация против листериоза путем первичной/бустерной инокуляции гена gun). *J Immunol* 163, 4510-4518.

15 Fensterle, J., Schwartz, V., Riedmiller, H., and Rapp, U. R. (2005). Animal models for DNA vaccination against prostate cancer using PSA encoding plasmids. (Модели на животных ДНК-вакцинации против рака простаты с использованием PSA-кодирующих плазмид). *Onkologie* 28 (доп. 2), 52.

20 Freytag, L.C, and Clements, J.D. (1999). Bacterial toxins as mucosal adjuvants. (Бактериальные токсины как адъюванты для слизистых). *Curr Top Microbiol Immunol* 236, 215-236.

Freytag, L.C., and Clements, J.D. (2005). Mucosal adjuvants (Адъюванты для слизистых). *Vaccine* 23, 1804-1813.

25 Garmory, H.S., Brown, K.A., and Titball, R.W. (2002). *Salmonella* vaccines for use in humans: present and future perspectives. (Вакцины на основе *Salmonella*, предназначенные для применения у человека, настоящее и будущие перспективы). *FEMS Microbiol Rev* 26, 339-353.

30 Garmory, H.S., Titball, R.W., Griffin, K.F., Hahn, U., Bohm, R., and Beyer, W. (2003). *Salmonella enterica* serovar typhimurium expressing a chromosomally integrated copy of the *Bacillus anthracis* protective antigen gene protects mice against an anthrax spore challenge. (*Salmonella enterica* серовар typhimurium, экспрессирующая хромосомно интегрированную копию гена защитного антигена *Bacillus anthracis*, защищает мышей от заражения спорами сибирской язвы). *Infect Immun* 71, 3831-3836.

35 Gentshev, I., Dietrich, G., and Goebel, W. (2002a). The *E. coli* alpha-hemolysin secretion system and its use in vaccine development. (Система секреции α -гемолизина *E. coli* и ее использование в разработке вакцин) *Trends Microbiol* 10, 39-45.

40 Gentshev, I., Dietrich, G., Spreng, S., Pilgrim, S., Stritzker, J., Kolb-Maurer, A., and Goebel, W. (2002b). Delivery of protein antigens and DNA by attenuated intracellular bacteria. (Доставка белковых антигенов и ДНК посредством аттенюированных внутриклеточных бактерий). *Int J Med Microbiol* 291, 577-582.

45 Gentshev, I., Fensterle, J., Schmidt, A., Potapenko, T., Troppmair, J., Goebel, W., and Rapp, U.R. (2005). Use of a recombinant *Salmonella enterica* serovar typhimurium strain expressing C-Raf for protection against C-Raf induced lung adenoma in mice. (Использование рекомбинантного штамма *Salmonella enterica* serovar typhimurium, экспрессирующего C-Raf для защиты от индуцированной C-raf аденомы легкого у мышей). *BMC Cancer* 5, 15.

50 Gentshev, I., Mollenkopf, H., Sokolovic, Z., Hess, J., Kaufmann, S.H., and Goebel, W. (1996). Development of antigen-delivery systems, based on the *Escherichia coli* hemolysin secretion pathway. (Разработка систем доставки антигена на основе пути секреции гемолизина *Escherichia coli*) *Gene* 179, 133-140.

Gentshev, I., Dietrich, G., Spreng, S., Neuhaus, B., Maier, E., Benz, R., Goebel, W., Fensterle, J., and Rapp, U.R. (2004). Use of the alpha-hemolysin secretion system of *Escherichia coli* for antigen delivery in the *Salmonella typhi* Ty21a vaccine strain. (Использование системы секретиции α -гемолизина *Escherichia coli* для доставки антигена в вакцинном штамме *Salmonella typhi* Ty21a). *Int J Med Microbiol* 294, 363-371.

Gomez-Duarte, O.G., Galen, J., Chatfield, S.N., Rappuoli, R., Eidels, L., and Levine, M.M. (1995). Expression of fragment C of tetanus toxin fused to a carboxyl-terminal fragment of diphtheria toxin in *Salmonella typhi* CVD 908 vaccine strain. (Экспрессия фрагмента C столбнячного токсина, слитого в карбоксил-концевым фрагментом дифтерийного токсина в вакцинном штамме *Salmonella typhi* CVD 908). *Vaccine* 13, 1596-1602.

Hajishengallis, G., Harokopakis, E., Hollingshead, S.K., Russell, M.W., and Michaiek, S.M. (1996). Construction and oral immunogenicity of a *Salmonella typhimurium* strain expressing a streptococcal adhesin linked to the A2/B subunits of cholera toxin. (Конструирование и пероральная иммуногенность штамма *Salmonella typhimurium*, экспрессирующего стрептококковый адгезин, связанный с субъединицами A2/B холерного токсина). *Vaccine* 14, 1545-1548.

Hajishengallis, G., Nawar, H., Tapping, R.I., Russell, M.W., and Connell, T.D. (2004). The Type II heat-labile enterotoxins LT-IIa and LT-IIb and their respective B pentamers differentially induce and regulate cytokine production in human monocytic cells. (Термолabile энтеротоксины типа II LT-IIa и их соответствующие B-пентамеры дифференцируют индуцируют и регулируют продукцию человеческих моноцитарных клеток). *Infect Immun* 72, 6351-6358.

Harokopakis, E., Hajishengallis, G., Greenway, T.E., Russell, M.W., and Michaiek, S.M. (1997). Mucosal immunogenicity of a recombinant *Salmonella typhimurium*-cloned heterologous antigen in the absence or presence of coexpressed cholera toxin A2 and B subunits. (Иммуногенность для слизистых клонированного в рекомбинантную *Salmonella typhimurium* гетерологичного антигена в отсутствие или в присутствии соэкспрессированных A2- и B-субъединиц холерного токсина) *Infect Immun* 65, 1445-1454.

Hess, J., Gentshev, I., Miko, D., Welzel, M., Ladel, C., Goebel, W., and Kaufmann, S.H. (1996). Superior efficacy of secreted over somatic antigen display in recombinant *Salmonella* vaccine induced protection against listeriosis. (Повышенная эффективность представления секретированного относительно соматического антигена в вакцине на основе рекомбинантной *Salmonella*, индуцирующей защиту от листериоза). *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 1458-1463.

Holmgren, J., Adamsson, J., Anjuere, F., Clemens, J., Czerkinsky, C., Eriksson, K., Flach, C.F., George-Chandy, A., Harandi, A.M., Lebens, M., et al. (2005). Mucosal adjuvants and anti-infection and anti-immunopathology vaccines based on cholera toxin, cholera toxin B subunit and CpG DNA. (Адъюванты для слизистых и вакцины против инфекций и иммунопатологий на основе субъединицы B холерного токсина и ДНК CpG). *Immunol Lett* 97, 181-188.

Holmgren, J., and Czerkinsky, C. (2005). Mucosal immunity and vaccines. (Иммунитет слизистых и вакцины). *Nat Med* 11, S45-53.

Holmgren, J., Czerkinsky, C., Eriksson, K., and Mharandi, A. (2003). Mucosal immunisation and adjuvants: a brief overview of recent advances and challenges. (Иммунизация и адъюванты для слизистых - краткий обзор современных достижений и проблем). *Vaccine* 21 доп. 2, S89-95.

Hormozi, K., Parton, R., and Coote, J. (1999). Adjuvant and protective properties of native

and recombinant *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin preparations in mice.

(Адьювантные и защитные свойства препаратов токсина аденилатциклазы нативной и рекомбинантной *Bordetella pertussis* у мышей). FEMS Immunol Med Microbiol 23, 273-282.

5 Huang, Y., Hajishengallis, G., and Michaiek, S.M. (2000). Construction and characterization of a *Salmonella enterica* serovar typhimurium clone expressing a salivary adhesin of *Streptococcus mutans* under control of the anaerobically inducible *nirB* promoter.

10 (Конструирование и характеристика клона *Salmonella enterica* серовар typhimurium, экспрессирующего слюнный адгезин *Streptococcus mutans* под контролем анаэробного индуцируемого промотора *nirB*). Infect Immun 68, 1549-1556.

Hunt, P.D., and Hardy, S.J. (1991). Heat-labile enterotoxin can be released from *Escherichia coli* cells by host intestinal factors. (Термолабильный энтеротоксин может быть

15 высвобожден из клеток *Escherichia coli* посредством кишечных факторов хозяина). Infect Immun 59, 168-171.

Jackson, R.J., Marinaro, M., VanCott, J.L., Yamamoto, M., Okahashi, N., Fujihashi, K., Kiyono, H., Chatfield, S.N., and McGhee, J.R. (1996). Mucosal immunity: regulation by helper T cells and a novel method for detection. (Иммунитет слизистых - регуляция Т-клетками-

20 хелперами и новый метод детекции). J Biotechnol 44, 209-216.

Jagusztyn-Krynicka, E.K., Clark-Curtiss, J.E., and Curtiss, R., 3rd (1993). *Escherichia coli* heat-labile toxin subunit B fusions with *Streptococcus sobrinus* antigens expressed by *Salmonella typhimurium* oral vaccine strains: importance of the linker for antigenicity and biological activities of the hybrid proteins. (Слияния В-субъединицы термолабильного

25 токсина *Escherichia coli* с антигенами *Streptococcus sobrinus*, экспрессируемыми пероральными вакцинными штаммами *Salmonella typhimurium* - важность линкера для антигенности и биологической активности гибридных белков). Infect Immun 61, 1004-1015.

30 Khan, C.M., Villarreal-Ramos, B., Pierce, R.J., Demarco de Hormaeche, R., McNeill, H., Ali, T., Chatfield, S., Capron, A., Dougan, G., and Hormaeche, C. E. (1994a). Construction, expression, and immunogenicity of multiple tandem copies of the *Schistosoma mansoni* peptide 115-131 of the P28 glutathione S-transferase expressed as C-terminal fusions to tetanus toxin fragment C in a live aro-attenuated vaccine strain of *Salmonella*. (Конструирование,

35 экспрессия и иммуногенность множества tandemных копий пептида 115-131 глутатион-трансферазы S *Schistosoma mansoni* P28, экспрессируемой в виде С-концевых слияний с фрагментом С столбнячного токсина в живом аро-аттенюированном вакцинном штамме *Salmonella*). J Immunol 153, 5634-5642.

40 Khan, C.M., Villarreal-Ramos, B., Pierce, R.J., Riveau, G., Demarco de Hormaeche, R., McNeill, H., Ali, T., Fairweather, N., Chatfield, S., Capron, A., and et al. (1994b). Construction, expression, and immunogenicity of the *Schistosoma mansoni* P28 glutathione S-transferase as a genetic fusion to tetanus toxin fragment C in a live Aro attenuated vaccine strain of *Salmonella*. (Конструирование, экспрессия и иммуногенность глутатион-

45 трансферазы S *Schistosoma mansoni* P28 как генетического слияния с фрагментом С столбнячного токсина в живом Aro-аттенюированном вакцинном штамме *Salmonella*). Proc Natl Acad Sci USA 91, 11261-11265.

Konieczny, M.P., Suhr, M., Noll, A., Autenrieth, I.B., and Alexander Schmidt, M. (2000). Cell surface presentation of recombinant (poly-) peptides including functional T- cell epitopes by the AIDA autotransporter system. (Презентация на клеточной поверхности

50 рекомбинантных полипептидов, включающих функциональные Т-клеточные эпитопы, посредством системы аутотранспортеров AIDA). FEMS Immunol Med

Microbiol 27, 321-332.

Koprowski, H., 2nd, Levine, M.M., Anderson, R.J., Losonsky, G., Pizza, M., and Barry, E.M. (2000). Attenuated *Shigella flexneri* 2a vaccine strain CVD 1204 expressing colonization factor antigen I and mutant heat-labile enterotoxin of enterotoxigenic *Escherichia coli*.

(Аттенюированный вакцинный штамм *Shigella flexneri* 2a CVD 1204, экспрессирующий антиген фактора колонизации и мутантный термолабильный энтеротоксин энтеротоксигенной *Escherichia coli*). Infect Immun 68, 4884-4892.

Kweon, M.N., Yamamoto, M., Watanabe, F., Tamura, S., Van Ginkel, F.W., Miyauchi, A., Takagi, H., Takeda, Y., Hamabata, T., Fujihashi, K., et al. (2002). A nontoxic chimeric enterotoxin adjuvant induces protective immunity in both mucosal and systemic compartments with reduced IgE antibodies. (Адьювант на основе нетоксичного химерного энтеротоксина индуцирует защитный иммунитет в обоих, слизистом и системном отделах с пониженным уровнем антител IgE). J Infect Dis 186, 1261-1269.

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. (Расщепление структурных белков во время сборки бактериофага T4). Nature 227, 680-685.

Lahiri, S.S. (2000). Bacterial toxins - an overview. (Бактериальные токсины - обзор) J Nat Toxins 9, 381-408.

Lavelle, E.C., McGuirk, P., and Mills, K.H. (2004). Molecules of infectious agents as immunomodulatory drugs. (Молекулы инфекционных агентов как иммуномодулирующие лекарственные препараты). Curr Top Med Chem 4, 499-508.

Lee, J.J., Sinha, K.A., Harrison, J.A., de Hormaeche, R.D., Riveau, G., Pierce, R.J., Capron, A., Wilson, R.A., and Khan, C.M. (2000). Tetanus toxin fragment C expressed in live *Salmonella* vaccines enhances antibody responses to its fusion partner *Schistosoma haematobium* glutathione S-transferase. (Фрагмент C столбнячного токсина, экспрессируемый в живых вакцинах *Salmonella*, усиливает ответы антител на его партнера слияния глутатион S-трансферазу *Schistosoma haematobium*). Infect Immun 68, 2503-2512.

Loeffler, D.I., Schoen, C.U., Goebel, W., and Pilgrim, S. (2006). Comparison of different live vaccine strategies in vivo for delivery of protein antigen or antigen-encoding DNA and mRNA by virulence-attenuated *Listeria monocytogenes*. (Сравнение различных стратегий живых вакцин in vivo для доставки белкового антигена или кодирующей антиген ДНК и мРНК с использованием *Listeria monocytogenes* с аттенюированной вирулентностью). Infect Immun 74, 3946-3957.

Loessner, M.J., Wendlinger, G., and Scherer, S. (1995). Heterogeneous endolysins in *Listeria monocytogenes* bacteriophages: a new class of enzymes and evidence for conserved holin genes within the siphoviral lysis cassettes. (Гетерогенные эндолизины бактериофагов *Listeria monocytogenes* - новый класс ферментов и подтверждение присутствия консервативных генов холина в сифовирусных лизирующих кассетах). Mol Microbiol 16, 1231-1241.

Lycke, N. (2005). From toxin to adjuvant: basic mechanisms for the control of mucosal IgA immunity and tolerance. (От токсина к адьюванту - основные механизмы контроля иммунитета IgA слизистых и толерантности). Immunol Lett 97, 193-198.

Lycke, N., Tsuji, T., and Holmgren, J. (1992). The adjuvant effect of *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli* heat-labile enterotoxins is linked to their ADP-ribosyltransferase activity. (Адьювантный эффект термолабильных энтеротоксинов *Vibrio cholerae* и *Escherichia coli* связан с активностью АДФ-рибозилтрансферазы). Eur J Immunol 22, 2277-2281.

McSorley, S.J., Rask, C., Pichot, R., Julia, V., Czerkinsky, C., and Glaichenhaus, N. (1998).

Selective tolerization of Th1-like cells after nasal administration of a cholera toxoid-LACK conjugate. (Избирательная толеризация Th1-подобных клеток после назального введения конъюгата холерный токсин-ЛАСК). *Eur J Immunol* 28, 424-432.

Mendelson, I., Gat, O., Aloni-Grinstein, R., Altboum, Z., Inbar, I., Kronman, C., Bar-Haim, E., Cohen, S., Velan, B., and Shafferman, A. (2005). Efficacious, nontoxicogenic *Bacillus anthracis* spore vaccines based on strains expressing mutant variants of lethal toxin components. (Эффективные нетоксигенные споровые вакцины *Bacillus anthracis* на основе штаммов, экспрессирующих мутантные варианты компонентов летального токсина). *Vaccine*, 23, 5688-5697.

Mesnage, S., Weber-Levy, M., Haustant, M., Mock, M., and Fouet, A. (1999). Cell surface-exposed tetanus toxin fragment C produced by recombinant *Bacillus anthracis* protects against tetanus toxin. (Фрагмент С столбнячного токсина, представляемого на клеточной поверхности, продуцируемый рекомбинантным *Bacillus anthracis*, защищает от столбнячного токсина). *Infect Immun* 67, 4847-4850.

Michalkiewicz, J., Stachowski, J., Barth, C., Patzer, J., Dzierzanowska, D., and Madalinski, K. (1999). Effect of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A on IFN-gamma synthesis: expression of costimulatory molecules on monocytes and activity of NK cells. (Эффект эндотоксина А *Pseudomonas aeruginosa* на синтез ИФН-γ: экспрессия костимулирующих молекул на моноциты и активность НК-клеток). *Immunol Lett* 69, 359-366.

Michl, P., and Gress, T.M. (2004). Bacteria and bacterial toxins as therapeutic agents for solid tumors. (Бактерии и бактериальные токсины в качестве лечебных факторов для солидных опухолей). *Curr Cancer Drug Targets* 4, 689-702.

Morona, R., Manning, P.A., and Reeves, P. (1983). Identification and characterization of the TolC protein, an outer membrane protein from *Escherichia coli*. (Идентификация и характеристика белка TolC, белка наружной мембраны из *Escherichia coli*). *J Bacteriol* 153, 693-699.

Muhlen, K.A., Schumann, J., Wittke, F., Stenger, S., Van Rooijen, N., Van Kaer, L., and Tiegs, G. (2004). NK cells, but not NKT cells, are involved in *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A-induced hepatotoxicity in mice. (NK-клетки, но не NKT-клетки участвуют в гепатотоксичности, индуцируемой экзотоксином А *Pseudomonas aeruginosa*, у мышей). *J Immunol* 172, 3034-3041.

Mutsch, M., Zhou, W., Rhodes, P., Bopp, M., Chen, R.T., Under, T., Spath, C., and Steffen, R. (2004). Use of the inactivated intranasal influenza vaccine and the risk of Bell's palsy in Switzerland. (Использование инактивированной интраназальной вакцины против гриппа и риск развития паралича Белла в Швейцарии). *N Engl J Med* 350, 896-903.

Orr, N., Galen, J.E., and Levine, M.M. (1999). Expression and immunogenicity of a mutant diphtheria toxin molecule, CRM(197), and its fragments in *Salmonella typhi* vaccine strain CVD 908-htrA. (Экспрессия и иммуногенность мутантной молекулы дифтерийного токсина CRM(197) и ее фрагментов в вакцинном штамме *Salmonella typhi* CVD 908-htrA). *Infect Immun* 67, 4290-4294.

Poggi, A., Spada, F., Costa, P., Tomasello, E., Revello, V., Pella, N., Zocchi, M.R., and Moretta, L. (1996). Dissection of lymphocyte function-associated antigen 1-dependent adhesion and signal transduction in human natural killer cells shown by the use of cholera or pertussis toxin. (Анализ ассоциированной с функцией лимфоцитов антиген 1-зависимой адгезии и сигнальной трансдукции в человеческих натуральных клетках-киллерах, показанной с использованием холерного токсина или токсина коклюша) *Eur J Immunol* 26, 967-975.

Pogonka, T., Klotz, C., Kovacs, F., and Lucius, R. (2003). A single dose of recombinant

Salmonella typhimurium induces specific humoral immune responses against heterologous *Eimeria tenella* antigens in chicken. (Однократная доза рекомбинантной *Salmonella typhimurium* индуцирует специфические гуморальные иммунные ответы в отношении гетерологичных антигенов *Eimeria tenella* у кур). *Int J Parasitol* 33, 81-88.

Ramirez, R., Carracedo, J., Zamzami, N., Castedo, M., and Kroemer, G. (1994). Pertussis toxin inhibits activation-induced cell death of human thymocytes, pre-B leukemia cells and monocytes. (Токсин коклюша ингибирует индуцированную активацией гибель человеческих тимоцитов, предлейкозных В-клеток и моноцитов). *J Exp Med* 180, 1147-1152.

Ranallo, R.T., Fonseka, C.P., Cassels, F., Srinivasan, J., and Venkatesan, M.M. (2005). Construction and characterization of bivalent *Shigella flexneri* 2a vaccine strains SC608 (pCFAI) and SC608(pCFAI/LTB) that express antigens from enterotoxigenic *Escherichia coli*. (Конструирование и характеристика бивалентных вакцинных штаммов *Shigella flexneri* 2a SC608(pCFAI) и SC608(pCFAI/LTB), которые экспрессируют антигены из энтеротоксигенной *Escherichia coli*). *Infect Immun* 73, 258-267.

Reveneau, N., Geoffroy, M. C, Loch, C, Chagnaud, P., and Mercenier, A. (2002). Comparison of the immune responses induced by local immunizations with recombinant *Lactobacillus plantarum* producing tetanus toxin fragment C in different cellular locations. (Сравнение иммунных ответов, индуцированных местными иммунизациями рекомбинантной *Lactobacillus plantarum*, продуцирующей фрагмент С столбнячного токсина в различных местоположениях клетки). *Vaccine* 20, 1769-1777.

Roland, K. L, Tinge, S. A., Killeen, K. P., and Kochi, S. K. (2005). Recent advances in the development of live, attenuated bacterial vectors. (Современные достижения в создании живых аттенюированных бактериальных векторов). *Curr Opin Mol Ther* 7, 62-72.

Rosenberg, S. A. (2001). Progress in human tumour immunology and immunotherapy. (Развитие иммунологии и иммунотерапии опухолей человека). *Nature* 411, 380-384.

Ryan, E.T., Butters, J.R., Smith, R.N., Carroll, P.A., Crean, T.I., and Calderwood, S.B. (1997a). Protective immunity against *Clostridium difficile* toxin A induced by oral immunization with a live, attenuated *Vibrio cholerae* vector strain. (Защитный иммунитет против токсина А *Clostridium difficile*, индуцируемый пероральной иммунизацией живым аттенюированным векторным штаммом *Vibrio cholerae*). *Infect Immun* 65, 2941-2949.

Ryan, E.T., Butters, J.R., Zhang, T., Baker, M.A., Stanley, S.L., Jr., and Calderwood, S.B. (1997b). Oral immunization with attenuated vaccine strains of *Vibrio cholerae* expressing a dodecapeptide repeat of the serine-rich *Entamoeba histolytica* protein fused to the cholera toxin B subunit induces systemic and mucosal antiamebic and anti-*V. cholerae* antibody responses in mice. (Пероральная иммунизация аттенюированными вакцинными штаммами *Vibrio cholerae*, экспрессирующими додекапептидный повтор богатого серином белка *Entamoeba histolytica*, слитый с В-субъединице и холерного токсина, индуцирует системный и слизистый ответы антиамебных антител и антител к *V. cholerae* у мышей). *Infect Immun* 65, 3118-3125.

Sanchez, J., Wallerstrom, G., Frednks, M., Angstrom, J., and Holmgren, J. (2002). Detoxification of cholera toxin without removal of its immunoadjuvanticity by the addition of (STa-related) peptides to the catalytic subunit. A potential new strategy to generate immunostimulants for vaccination. (Детоксификация холерного токсина без удаления его иммуноаdjувантности путем добавления (STa-родственных) пептидов к каталитической субъединице. Потенциальная новая стратегия генерации иммуностимуляторов для вакцинации). *J Biol Chem* 277, 33369-33377.

Sanchez, A.E., Aquino, G., Ostoa-Saloma, P., Laclette, J.P., and Rocha-Zavaleta, L (2004). Cholera toxin B-subunit gene enhances mucosal Immunoglobulin A, Th1-type and CD⁸⁺ cytotoxic responses when co-administered intradermally with a DNA vaccine. (Ген В-субъединицы холерного токсина усиливает ответы иммуноглобулина А слизистых, Th1-типа и цитотоксических ответов CD⁸⁺ при совместном введении внутрикожно с ДНК-вакциной). *Clinic Diagnost Laborat Immun* 11, 711-719.

Schmid-Grendelmeier, P., and Cramer, R. (2001). Recombinant allergens for skin testing. (Рекомбинантные аллергены для кожного тестирования). *Int Arch Allergy Immunol* 125, 96-111.

Schodel, F., Enders, G., Jung, M.C, and Will, H. (1990). Recognition of a hepatitis B virus nucleocapsid T-cell epitope expressed as a fusion protein with the subunit B of Escherichia coli heat labile enterotoxin in attenuated salmonellae. (Распознавание Т-клеточного эпитопа нуклеокапсида вируса гепатита С, экспрессируемого в виде слитого белка с субъединицей В термолабильного энтеротоксина Escherichia coli в аттенюированных сальмонеллах). *Vaccine* 8, 569-572.

Shaw, C.A., and Starnbach, M.N. (2003). Using Modified Bacterial Toxins to Deliver Vaccine Antigens. *ASM News* 69, 384-389. Silva, A.J., Mohan, A., and Benitez, J.A. (2003). Cholera vaccine candidate 638: intranasal immunogenicity and expression of a foreign antigen from the pulmonary pathogen Coccidioides immitis. (Кандидат холерной вакцины 638 - интраназальная иммуногенность и экспрессия чужеродного антигена, выделенного из легочного патогена Coccidioides immitis). *Vaccine* 21, 4715-4721.

Smerdou, C, Anton, I.M., Plana, J., Curtiss, R., 3rd, and Enjuanes, L (1996). A continuous epitope from transmissible gastroenteritis virus S protein fused to E. coli heat-labile toxin B subunit expressed by attenuated Salmonella induces serum and secretory immunity. (Постоянный эпитоп из S-белка трансмиссивного вируса гастроэнтерита, слитый с субъединицей В термолабильного токсина E. coli, экспрессируемый аттенюированной Salmonella, индуцирует сывороточный и секреторный иммунитет). *Virus Res* 41, 1-9.

Somner, E.A., Ogun, S.A., Sinha, K.A., Spencer Valero, L.M., Lee, J.J., Harrison, J.A., Holder, A.A., Normaeche, C.E., and Khan, C.M. (1999). Expression of disulphide - bridge-dependent conformational epitopes and immunogenicity of the carboxy-terminal 19 kDa domain of Plasmodium yoelii merozoite surface protein-1 in live attenuated Salmonella vaccine strains. (Экспрессия зависимых от дисульфидных мостиков конформационных эпитопов и иммуногенность карбокси-концевого домена 19 кД поверхностного белка-1 мерозитов Plasmodium yoelii в живых аттенюированных вакцинных штаммах Salmonella. *Microbiology* 145 (часть 1), 221-229.

Sory, M.P., and Cornelis, G.R. (1990). Delivery of the cholera toxin B subunit by using a recombinant Yersinia enterocolitica strain as a live oral carrier. (Доставка субъединицы В холерного токсина с использованием рекомбинантного штамма Yersinia enterocolitica в качестве живого перорального носителя). *Res Microbiol* 141, 921-929.

Spangrude, G.J., Sacchi, F., Hill, H.R., Van Epps, D.E., and Daynes, R.A. (1985). Inhibition of lymphocyte and neutrophil chemotaxis by pertussis toxin. (Ингибирование хемотаксиса лимфоцитов и нейтрофилов посредством токсина коклюша). *J Immunol* 135, 4135-4143.

Su, G.F., Brahmbhatt, H.N., de Lorenzo, V., Wehland, J., and Timmis, K.N. (1992). Extracellular export of Shiga toxin B-subunit/haemolysin A (C-terminus) fusion protein expressed in Salmonella typhimurium aroA-mutant and stimulation of B-subunit specific antibody responses in mice. (Внеклеточный экспорт слитого белка В-субъединицы шига-токсина/гемолизина А (С-конца), экспрессируемого в мутанте Salmonella typhimurium

aroA, и стимуляция ответов В-субъединица-специфических антител у мышей). *Microb Pathog* 13, 465-476.

Thungapathra, M., Sharma, C, Gupta, N., Ghosh, R.K., Mukhopadhyay, A., Koley, H., Nair, G.B., and Ghosh, A. (1999). Construction of a recombinant live oral vaccine from a non-toxigenic strain of *Vibrio cholerae* 01 serotype inaba biotype E1 Tor and assessment of its reactogenicity and immunogenicity in the rabbit model. (Конструирование рекомбинантной живой пероральной вакцины из нетоксигенного штамма *Vibrio cholerae* 01 серотип inaba биотип E1 Tor и оценка его реактогенности и

иммуногенности на модели на кроликах). *Immunol Lett* 68, 219-227.

Todar, K. (2002). Mechanism of bacterial pathogenicity: protein toxins. *Todar's Online Textbook of Bacteriology*. (Механизм бактериальной патогенности: белковые токсины. Основное руководство по бактериологии Тодара): <http://textbookofbacteriology.net/proteintoxins.html>.

Tzschaschel, B.D., Guzman, C.A., Timmis, K.N., and de Lorenzo, V. (1996a). An *Escherichia coli* hemolysin transport system-based vector for the export of polypeptides: export of Shiga-like toxin NeB subunit by *Salmonella typhimurium* aroA. (Система транспорта гемолизина *Escherichia coli* на основе вектора для экспорта полипептидов: экспорт субъединицы NeB шига-подобного токсина посредством *Salmonella typhimurium* aroA). *Nat Biotechnol* 14, 765-769.

Tzschaschel, B.D., Klee, S.R., de Lorenzo, V., Timmis, K.N., and Guzman, C.A. (1996b). Towards a vaccine candidate against *Shigella dysenteriae* 1: expression of the Shiga toxin B-subunit in an attenuated *Shigella flexneri* aroD carrier strain. (К созданию потенциальной вакцины против *Shigella dysenteriae* 1: экспрессия В-субъединицы шига-токсина в аттенюированном штамме-носителе *Shigella flexneri* aroD). *Microb Pathog* 21, 277-288.

van Ginkel, F.W., Jackson, R.J., Yuki, Y., and McGhee, J.R. (2000). Cutting edge: the mucosal adjuvant cholera toxin redirects vaccine proteins into olfactory tissues. (Давущее преимущество свойство - адъювантный холерный токсин для слизистых перенаправляет вакцинные белки в обонятельные ткани). *J Immunol* 165, 4778-4782.

Vertiev, Y.V., Zdanovsky, A.G., Shevelev, A.B., Bonnskaya, S. A., Gening, E.L., Martin, T., Ivanov, P.A., and Yankovsky, N.K. (2001). Recombinant *Listeria* strains producing the nontoxic L-chain of botulinum neurotoxin A in a soluble form. (Рекомбинантные штаммы *Listeria*, продуцирующие нетоксичную L-цепь ботулинического нейротоксина А в растворимой форме). *Res Microbiol* 152, 563-567.

Walker, M.J., Rohde, M., Timmis, K.N., and Guzman, C.A. (1992). Specific lung mucosal and systemic immune responses after oral immunization of mice with *Salmonella typhimurium* aroA, *Salmonella typhi* Ty21a, and invasive *Escherichia coli* expressing recombinant pertussis toxin S1 subunit. (Специфические легочные ответы слизистых и системные иммунные ответы после пероральной иммунизации мышей *Salmonella typhimurium* aroA, *Salmonella typhi* Ty21 а и инвазионной *Escherichia coli*, экспрессирующей рекомбинантную S1-субъединицу токсина коклюша). *Infect Immun* 60, 4260-4268.

Ward, S.J., Douce, G., Figueiredo, D., Dougan, G., and Wren, B.W. (1999). Immunogenicity of a *Salmonella typhimurium* aroA aroD vaccine expressing a nontoxic domain of *Clostridium difficile* toxin A. (Иммуногенность вакцины *Salmonella typhimurium* aroA aroD, экспрессирующей нетоксичный домен токсина А *Clostridium difficile*). *Infect Immun* 67, 2145-2152.

Wiener, M.C. (2000). Bacterial export takes its Tol. (Бактериальный экспорт использует свой Tol). *Structure* 8, FM 71-175.

Wu, S., Beier, M., Sztein, M.B., Galen, J., Pickett, T., Holder, A.A., Gomez-Duarte, O.G.,

and Levine, M.M. (2000). Construction and immunogenicity in mice of attenuated *Salmonella typhi* expressing *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1 (MSP-1) fused to tetanus toxin fragment (Конструирование и иммуногенность у мышей аттенюированной *Salmonella typhi*, экспрессирующей поверхностный белок 1 мерозоитов *Plasmodium falciparum* (MSP-1), слитый с фрагментом С столбнячного токсина). *J Biotechnol* 83, 125-135.

Zheng, J.P., Zhang, Z.S., Li, S.Q., Liu, X.X., Yuan, S. L1 Wang, P., Zhan, D.W., Wang, L C, and Huang, C.F. (2005). Construction of a novel *Shigella* live-vector strain co-expressing CS3 and LTb/STm of enterotoxigenic *E. coli*. (Конструирование нового живого векторного штамма *Shigella*, соэкспрессирующего CS3 и LTb/STm энтеротоксигенной *E. coli*). *World J Gastroenterol* 11, 3411-3418.

Zhu, C, Ruiz-Perez, F., Yang, Z., Mao, Y., Hackethal, V.L, Greco, K.M., Choy, W., Davis, K., Butter-ton, J.R., and Boedeker, E.C. (2006). Delivery of heterologous protein antigens via hemolysin or autotransporter systems by an attenuated *ler* mutant of rabbit enteropathogenic *Escherichia coli*. (Доставка гетерологичных белковых антигенов посредством систем гемолизина или аутотранспортёров с помощью *ler*-мутанта или кроличьей энтеропатогенной *Escherichia coli*). *Vaccine* 24, 3821-3831.

Формула изобретения

1. Микроорганизм-носитель нуклеотидных последовательностей, кодирующих антигены и белковые токсины, включающий первый компонент, представленный по меньшей мере одной нуклеотидной последовательностью, кодирующей по меньшей мере один полный или неполный антиген из по меньшей мере одного белка дикого типа или мутантного белка, второй компонент, представленный по меньшей мере одной нуклеотидной последовательностью, кодирующей по меньшей мере один белковый токсин и/или по меньшей мере одну субъединицу белкового токсина, третий компонент, состоящий по меньшей мере из одного первого подкомпонента, представленного по меньшей мере одной нуклеотидной последовательностью, кодирующей по меньшей мере одну систему транспорта, облегчающую экспрессию продуктов экспрессии первого и второго вышеупомянутых компонентов на наружной поверхности микроорганизма и/или облегчающую секрецию продуктов экспрессии первого и второго компонентов, и/или кодирующей по меньшей мере одну сигнальную последовательность, которая облегчает секрецию продуктов экспрессии первого и второго компонентов, и/или, необязательно, из второго подкомпонента, представленного по меньшей мере одной нуклеотидной последовательностью, кодирующей по меньшей мере один белок для лизиса микроорганизма в цитозоле клеток млекопитающих и для внутриклеточного высвобождения плазмид или векторов экспрессии, которые содержатся в лизированном микроорганизме, и четвертый компонент, представленный по меньшей мере одной нуклеотидной последовательностью для по меньшей мере одной последовательности активации для экспрессии по меньшей мере одного первого, второго или третьего компонентов, при этом указанная последовательность активации активируется в микроорганизме и/или является специфической для клетки ткани, специфической для опухолевой клетки, макрофаг-специфической, дендрит-специфической, лимфоцит-специфической, функция-специфической или неспецифической в отношении клетки, причем любой первый, второй, третий или четвертый компоненты, представленные в указанном микроорганизме более одного раза, являются независимо друг от друга

идентичными или отличающимися, при этом первый и второй компоненты отличны друг от друга.

2. Микроорганизм по п.1, который выбран из группы, включающей бактерии, грамположительной бактерии, грамотрицательной бактерии и эукариотической клетки, а именно, *Escherichia* spp., *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Salmonella typhi*, *Salmonella typhimurium*, *Yersinia* spp., *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio* spp., *Vibrio cholerae*, *Listeria* spp., *Listeria monocytogenes*, *Shigella* spp., *Shigella flexneri*, *Yersinia* spp. *Pseudomonas* spp., при этом вирулентность микроорганизма может быть

3. Микроорганизм по п.1, который выбран из группы, включающей бактерии, грамположительной бактерии, грамотрицательной бактерии и эукариотической клетки, а именно, *Escherichia* spp., *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Salmonella typhi*, *Salmonella typhimurium*, *Yersinia* spp., *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio* spp., *Listeria* spp., *Listeria monocytogenes*, *Shigella* spp., *Shigella flexneri*, *Yersinia* spp. *Pseudomonas* spp., при этом вирулентность микроорганизма может быть аттенюирована.

4. Микроорганизм по п.1, в котором по меньшей мере один полный или неполный антиген по меньшей мере одного белка дикого типа или мутантного белка, соответствующий первому компоненту, выбран из группы, включающей следующие белки дикого типа и их известные мутантные формы: рецептор, внеклеточная, трансмембранная или внутриклеточная часть рецептора, молекула адгезии, внеклеточная, трансмембранная или внутриклеточная часть молекулы адгезии, белок сигнальной трансдукции, белок клеточного цикла, фактор транскрипции, белок дифференцировки, эмбриональный белок, вирусный белок, аллерген, белок микробного патогена, белок эукариотического патогена, белок антигена рака яичка, белок опухолевого антигена и/или специфический белок клетки ткани, где клетка ткани выбрана из группы, включающей клетку щитовидной железы, молочной железы, слюнной железы, лимфатического узла, слизистой оболочки желудка, почки, яичника, простаты, шейки матки, серозной оболочки мочевого пузыря и невуса.

5. Микроорганизм по п.4, в котором по меньшей мере один полный или неполный антиген по меньшей мере одного белка дикого типа или мутантного белка, соответствующий первому компоненту, выбран из группы, включающей следующие белки дикого типа и их известные мутантные формы: Her-2/neu, андрогенный рецептор, эстрогенный рецептор, midkine-рецептор, рецептор EGF, рецептор ERBB2, ERBB4, рецептор TRAIL, FAS, рецептор TNF α , рецептор TGF- β , лактоферриновый рецептор, основной миелин, α -лактальбумин, GFAP, фибриллярный кислый белок, тирозиназа, EGR-1, MUC1, c-Raf (Raf-1), A-Raf, B-Raf, B-RafV599E, B-RafV600E, B-Raf KD, домен киназы B-RafV600E, B-Raf V600E KD, домен киназы KD B-RafV600E, домен киназы B-Raf, домен киназы KD B-Raf, N-Ras, K-Ras, H-Ras, Bcl-2, Bcl-X, Bcl-W, Bfl-1, Bcr-1, Mcl-1, Al, Bax, BAD, Bak, Bcl-Xs, Bid, Bik, Hrk, Bcr/abl, Myb, C-Met, IAP1, IAO2, XIAP, ML-IAP LIVIN, сурвивин, APAF-1, циклин D(1-3), циклин E, циклин A, циклин B, циклин H, Cdk-1, Cdk-2, Cdk-4, Cdk-6, Cdk-7, Cdc25C, p16, p15, p21, p27, p18, pRb, p107, p130, E2F(1-5), GAAD45, MDM2, PCNA, ARF, PTEN, APC, BRCA, Akt, PI3K, mTOR, p53 и гомологи, C-Мус, NFkB, c-Jun, ATF-2, Sp1, простата-специфический антиген (PSA), карциноэмбриональный антиген, α -фетопротеин, PAP; PSMA; STEAP; MAGE, MAGE-1, MAGE-3, NY-ESO-1, PSCA, MART, Gp100, тирозиназа, GRP, TCF-4, вирусные антигены вирусов ВИЧ, HPV, HCV, HPV, EBV, CMV, HSV, вируса гриппа, вируса гриппа типа А, вируса гриппа типа А (H5N1) и (H3N2), вируса гриппа типа В, вируса гриппа типа С, гемагглютинины, гемагглютинин H1, гемагглютинин H5,

гемагглютинин H7, гемагглютинин HA1 (предпочтительно из вируса гриппа A (A/Thailand/1(KAN-1)2004(H5N1)), гемагглютинин HA 12 (предпочтительно из вируса гриппа A (A/Thailand/1(KAN-1)2004(H5N1)), гемагглютинин HA12C (предпочтительно из вируса гриппа A (A/Thailand/1 (KAN-1)2004(H5N-1))),
 5 нейрамидазу, р60, LLO, уреазу, CSP, калфлагин и/или CPB, или в котором по меньшей мере один полный или неполный антиген по меньшей мере одного белка дикого типа или мутантного белка, соответствующий первому компоненту, выбран из группы киназ, включающей следующие белки дикого типа и их известные
 10 мутантные формы: (регистрационные номера приведены в скобках): AAK1 (NM 014911), AATK (NM 004920), ABL1 (NM 005157), ABL2 (NM 005158), ACK1 (NM 005781), ACVR1 (NM 001105), ACVR1B (NM 020328), ACVR2 (NM 001616), ACVR2B (NM 001106), ACVRL1 (NM 000020), ADCK1 (NM 020421), ADCK2 (NM 052853), ADCK4 (NM 024876), ADCK5 (NM 174922), ADRBK1 (NM 001619), ADRBK2 (NM 005160), AKT1
 15 (NM 005163), AKT2 (NM 001626), AKT3 (NM 005465), ALK (NM 004304), ALK7 (NM 145259), ALS2CR2 (NM 018571), ALS2CR7 (NM 139158), AMHR2 (NM 020547), ANKK1 (NM 178510), ANKRD3 (NM 020639), APEG1 (NM 005876), ARAF (NM 001654), ARK5 (NM 014840), ATM (NM 000051), ATR (NM 001184), AURKA (NM 003600), AURKB (NM
 20 004217), AURKC (NM 003160), AXL (NM 001699), BCKDK (NM 005881), BCR (NM 004327), BIKE (NM 017593), BLK (NM 001715), BMPR1 A (NM 004329), BMPR1 B (NM 001203), BMPR2 (NM 001204), BMX (NM 001721), BRAF (NM 004333), BRD2 (NM 005104), BRD3 (NM 007371), BRD4 (NM 014299), BRDT (NM 001726), BRSK1 (NM 032430), BRSK2 (NM 003957), BTK (NM 000061), BUB1 (NM 004336), BUB1 B (NM
 25 001211), CABO1 (NM 020247), CAMK1 (NM 003656), CaMK1b (NM 198452), CAMK1D (NM 020397), CAMK1G (NM 020439), CAMK2A (NM 015981), CAMK2B (NM 001220), CAMK2D (NM 001221), CAMK2G (NM 001222), CAMK4 (NM 001744), CAMKK1 (NM 032294), CAMKK2 (NM 006549), CASK (NM 003688), CCRK (NM 012119), CDC2 (NM
 30 001786), CDC2L1 (NM 001787), CDC2L5 (NM 003718), CDC42BPA (NM 014826), CDC42BPB (NM 006035), CDC7L1 (NM 003503), CDK10 (NM 003674), CDK11 (NM 015076), CDK2 (NM 001798), CDK3 (NM 001258), CDK4 (NM 000075), CDK5 (NM 004935), CDK6 (NM 001259), CDK7 (NM 001799), CDK8 (NM 001260), CDK9 (NM 001261), CDKL1 (NM 004196), CDKL2 (NM 003948), CDKL3 (NM 016508), CDKL4 (NM
 35 001009565), CDKL5 (NM 003159), CHEK1 (NM 001274), CHUK (NM 001278), CIT (NM 007174), CLK1 (NM 004071), CLK2 (NM 003993), CLK3 (NM 003992), CLK4 (NM 020666), CRK7 (NM 016507), CSF1R (NM 005211), CSK (NM 004383), CSNK1 A1 (NM 001892), CSNK1 D (NM 001893), CSNK1E (NM 001894), CSNK1 G1 (NM 022048), CSNK1 G2 (NM
 40 001319), CSNK1 G3 (NM 004384), CSNK2A1 (NM 001895), CSNK2A2 (NM 001896), DAPK1 (NM 004938), DAPK2 (NM 014326), DAPK3 (NM 001348), DCAMKL1 (NM 004734), DCAMKL2 (NM 152619), DCAMKL3 (XM 047355), DDR1 (NM 013993), DDR2 (NM 006182), DMPK (NM 004409), DMPK2 (NM 017525.1), DYRK1 A (NM 001396), DYRK1 B (NM 006484), DYRK2 (NM 006482), DYRK3 (NM 003582), DYRK4 (NM
 45 003845), EEF2K (NM 013302), EGFR (NM 005228), EIF2AK3 (NM 004836), EIF2AK4 (NM_001013703), EPHA1 (NM 005232), EPHA10 (NM 001004338), EPHA2 (NM 004431), EPHA3 (NM 005233), EPHA4 (NM 004438), EPHA5 (NM 004439), EPHA6 (XM 114973), EPHA7 (NM 004440), EPHA8 (NM 020526), EPHB1 (NM 004441), EPHB2 (NM 017449), EPHB3 (NM 004443), EPHB4 (NM 004444), EPHB6 (NM 004445), ERBB2 (NM 004448), ERBB3 (NM 001982), ERBB4 (NM 005235), ERK8 (NM 139021), ERN1 (NM 001433), ERN2 (NM 033266), FASTK (NM 025096), FER (NM 005246), FES (NM 002005), FGFR1 (NM 000604), FGFR2 (NM 022970), FGFR3 (NM 000142), FGFR4 (NM 022963), FGR (NM

005248), FLJ23074 (NM 025052), FLJ23119 (NM 024652), FLJ23356 (NM 032237), FLT1 (NM 002019), FLT3 (NM 004119), FLT4 (NM 002020), FRAP1 (NM 004958), FRK (NM 002031), FYN (NM 002037), GAK (NM 005255), GPRK5 (NM 005308), GPRK6 (NM 002082), GPRK7 (NM 139209), GRK4 (NM 005307), GSG2 (NM 031965), GSK3A (NM 019884), GSK3B (NM 002093), GUCY2C (NM 004963), GUCY2D (NM 000180), GUCY2F (NM 001522), H11 (NM 014365), HAK (NM 052947), HCK (NM 002110), HIPK1 (NM 152696), HIPK2 (NM 022740), HIPK3 (NM 005734), HIPK4 (NM 144685), HRI (NM 014413), HUNK (NM 014586), ICK (NM 016513), IGF1 R (NM 000875), IKBKB (NM 001556), IKBKE (NM 014002), ILK (NM 004517), INSR (NM 000208), INSRR (NM 014215), IRAKI (NM 001569), IRAK2 (NM 001570), IRAK3 (NM 007199), IRAK4 (NM 016123), ITK (NM 005546), JAK1 (NM 002227), JAK2 (NM 004972), JAK3 (NM 000215), KDR (NM 002253), KIS (NM 144624), KIT (NM 000222), KSR (XM 290793), KSR2 (NM 173598), LAK (NM 025144), LATS1 (NM 004690), LATS2 (NM 014572), LCK (NM 005356), LIMK1 (NM 016735), LIMK2 (NM 005569), LMR3 (XM 055866), LMTK2 (NM 014916), LOC149420 (NM 152835), LOC51086 (NM 015978), LRRK2 (XM 058513), LTK (NM 002344), LYN (NM 002350), MAK (NM 005906), MAP2K1 (NM 002755), MAP2K2 (NM 030662), MAP2K3 (NM 002756), MAP2K4 (NM 003010), MAP2K5 (NM 002757), MAP2K6 (NM 002758), MAP2K7 (NM 005043), MAP3K1 (XM 042066), MAP3K10 (NM 002446), MAP3K11 (NM 002419), MAP3K12 (NM 006301), MAP3K13 (NM 004721), MAP3K14 (NM 003954), MAP3K2 (NM 006609), MAP3K3 (NM 002401), MAP3K4 (NM 005922), MAP3K5 (NM 005923), MAP3K6 (NM 004672), MAP3K7 (NM 003188), MAP3K8 (NM 005204), MAP3K9 (NM 033141), MAP4K1 (NM 007181), MAP4K2 (NM 004579), MAP4K3 (NM 003618), MAP4K4 (NM 145686), MAP4K5 (NM 006575), MAPK1 (NM 002745), MAPK10 (NM 002753), MAPK11 (NM 002751), MAPK12 (NM 002969), MAPK13 (NM 002754), MAPK14 (NM 001315), MAPK3 (NM 002746), MAPK4 (NM 002747), MAPK6 (NM 002748), MAPK7 (NM 002749), MAPK8 (NM 002750), MAPK9 (NM 002752), MAPKAPK2 (NM 032960), MAPKAPK3 (NM 004635), MAPKAPK5 (NM 003668), MARK (NM 018650), MARK2 (NM 017490), MARK3 (NM 002376), MARK4 (NM 031417), MAST1 (NM 014975), MAST205 (NM 015112), MAST3 (XM 038150), MAST4 (XM 291141), MASTL (NM 032844), MATK (NM 139355), MELK (NM 014791), MERTK (NM 006343), MET (NM 000245), MGC33182 (NM 145203), MGC42105 (NM 153361), MGC43306 (C9orf96), MGC8407 (NM 024046), MIDORI (NM 020778), MINK (NM 015716), MKNK1 (NM 003684), MKNK2 (NM 017572), MLCK (NM 182493), MLK4 (NM 032435), MLKL (NM 152649), MOS (NM 005372), MST1 R (NM 002447), MST4 (NM 016542), MUSK (NM 005592), MYLK (NM 053025), MYLK2 (NM 033118), MYO3A (NM 017433), MYO3B (NM 138995), NEK1 (NM 012224), NEK10 (NM 152534), NEK11 (NM 024800), NEK2 (NM 002497), NEK3 (NM 002498), NEK4 (NM 003157), NEK5 (MGC75495), NEK6 (NM 014397), NEK7 (NM 133494), NEK8 (NM 178170), NEK9 (NM 033116), NLK (NM 016231), NPR1 (NM 000906), NPR2 (NM 003995), NRBP (NM 013392), NRBP2 (NM 178564), NRK (NM 198465), NTRK1 (NM 002529), NTRK2 (NM 006180), NTRK3 (NM 002530), OBSCN (NM 052843), OSR1 (NM 005109), PACE-1 (NM 020423), PAK1 (NM 002576), PAK2 (NM 002577), PAK3 (NM 002578), PAK4 (NM 005884), PAK6 (NM 020168), PAK7 (NM 020341), PASK (NM 015148), PCTK1 (NM 006201), PCTK2 (NM 002595), PCTK3 (NM 212503), PDGFRA (NM 006206), PDGFRB (NM 002609), PDK1 (NM 002610), PDK2 (NM 002611), PDK3 (NM 005391), PDK4 (NM 002612), PDPK1 (NM 002613), PFTK1 (NM 012395), PHKG1 (NM 006213), PHKG2 (NM 000294), PIK3R4 (NM 014602), PIM1 (NM 002648), PIM2 (NM 006875), PIM3 (NM 001001852), PINK1 (NM 032409), PKE (NM 173575), PKMYT1 (NM 004203), pkn β (NM 013355), PLK (NM 005030), PLK3 (NM 004073), PRKAA1 (NM 006251), PRKAA2 (NM

006252), PRKACA (NM 002730), PRKACB (NM 002731), PRKACG (NM 002732), PRKCA (NM 002737), PRKCB1 (NM 002738), PRKCD (NM 006254), PRKCE (NM 005400), PRKCG (NM 002739), PRKCH (NM 006255), PRKCI (NM 002740), PRKCL1 (NM 002741), PRKCL2 (NM 006256), PRKCM (NM 002742), PRKCN (NM 005813), PRKCQ (NM 006257), PRKCZ (NM 002744), PRKD2 (NM 016457), PRKDC (NM 006904), PRKG1 (NM 006258), PRKG2 (NM 006259), PRKR (NM 002759), PRKWNK1 (NM 018979), PRKWNK2 (NM 006648), PRKWNK3 (NM 020922), PRKWNK4 (NM 032387), PRKX (NM 005044), PRKY (NM 002760), PRPF4B (NM 003913), PSKH1 (NM 006742), PSKH2 (NM 033126), PTK2 (NM 005607), PTK2B (NM 004103), PTK6 (NM 005975), PTK7 (NM 002821), PTK9 (NM 002822), PTK9L (NM 007284), PXK (NM 017771), QSK (NM 025164), RAD53 (NM 007194), RAF1 (NM 002880), RAGE (NM 014226), RET (NM 020975), RHOK (NM 002929), RIOK1 (NM 031480), RIOK2 (NM 018343), RIPK1 (NM 003804), RIPK2 (NM 003821), RIPK3 (NM 006871), RIPK5 (NM 015375), RNASEL (NM 021133), ROCK1 (NM 005406), ROCK2 (NM 004850), ROR1 (NM 005012), ROR2 (NM 004560), ROS1 (NM 002944), RPS6KA1 (NM 002953), RPS6KA2 (NM 021135), RPS6KA3 (NM 004586), RPS6KA4 (NM 003942), RPS6KA5 (NM 004755), RPS6KA6 (NM 014496), RPS6KB1 (NM 003161), RPS6KB2 (NM 003952), RPS6KC1 (NM 012424), RPS6KL1 (NM 031464), RYK (NM 002958), SBK (XM 370948), SCYL1 (NM 020680), SCYL2 (NM 017988), SGK (NM 005627), SgK069 (SU SgK069), SgK085 (XM 373109), SgK110 (SU_SgKHO), SGK2 (NM 016276), SgK223 (XM 291277), SgK269 (XM 370878), SgK424 (CGP SgK424), SgK493 (SU_SgK493), SgK494 (NM 144610), SgK495 (NM 032017), SGKL (NM 013257), SK681 (NM 001001671), SLK (NM 014720), SMG1 (NM 015092), SNARK (NM 030952), SNF1 LK (NM 173354), SNF1 LK2 (NM 015191), SNK (NM 006622), SNRK (NM 017719), SRC (NM 005417), SRMS (NM 080823), SRPK1 (NM 003137), SRPK2 (NM 003138), SSTK (NM 032037), STK10 (NM 005990), STK11 (NM 000455), STK16 (NM 003691), STK17A (NM 004760), STK17B (NM 004226), STK18 (NM 014264), STK19 (NM 032454), STK22B (NM 053006), STK22C (NM 052841), STK22D (NM 032028), STK23 (NM 014370), STK24 (NM 003576), STK25 (NM 006374), STK3 (NM 006281), STK31 (NM 031414), STK32B (NM 018401), STK33 (NM 030906), STK35 (NM 080836), STK36 (NM 015690), STK38 (NM 007271), STK38L (NM 015000), STK39 (NM 013233), STK4 (NM 006282), STLK5 (NM 001003787), STYK1 (NM 018423), SUDD (NM 003831), SYK (NM 003177), TAF1 (NM 138923), TAF1 L (NM 153809), TAO1 (NM 004783), TAOK1 (NM 020791), TAOK3 (NM 016281), TBCK (NM 0331 15), TBK1 (NM 013254), TEC (NM 003215), TEK (NM 000459), TESK1 (NM 006285), TESK2 (NM 007170), TEX 14 (NM 031272), TGFBR1 (NM 004612), TGFBR2 (NM 003242), TIE (NM 005424), TIF1 (NM 003852), TLK1 (NM 012290), TLK2 (NM 006852), TNIK (NM 015028), TNK1 (NM 003985), TOPK (NM 018492), TP53RK (NM 033550), TRAD (NM 007064), TRIB1 (NM 025195), TRIB2 (NM 021643), TRIB3 (NM 021 158), TRIM28 (NM 005762), TRIM33 (NM 015906), TRIO (NM 0071 18), TRPM6 (NM 017662), TRPM7 (NM 017672), TRRAP (NM 003496), TSSK4 (NM 174944), TTBK1 (NM 032538), TTBK2 (NM 173500), TTK (NM 003318), TTN (NM 003319), TXK (NM 003328), TYK2 (NM 003331), TYR03 (NM 006293), ULK1 (NM 003565), ULK2 (NM 014683), ULK3 (NM 015518), ULK4 (NM 017886), VRK1 (NM 003384), VRK2 (NM 006296), VRK3 (NM 016440), WEE1 (NM 003390), Wee1 B (NM 173677), YANK1 (NM 145001), YES1 (NM 005433), ZAK (NM 016653) и/или ZAP70 (NM 001079).

6. Микроорганизм по п.1, в котором второй компонент выбран из группы, включающей бактериальный токсин, энтеротоксин, экзотоксин, токсин типа I, токсин типа II, токсин типа III, токсин типа IV, токсин типа V, токсин RTX, токсин AB, токсин A-B, токсин A/B, токсин A+B, токсин A-5 B и токсин AB5.

7. Микроорганизм по п.6, в котором второй компонент выбран из группы, включающей токсин аденилатциклазы, токсин сибирской язвы, токсин сибирской язвы (EF), токсин сибирской язвы (LF), ботулинический токсин, холерный токсин (СТ, Ctx), субъединицу холерного токсина В (СТВ, CtxB), дифтерийный токсин (DT, Dtx), токсин *E. coli* LT, термолабильный энтеротоксин *E. coli* (LT), субъединицу В термолабильного энтеротоксина *E. coli* (LTB), токсин *E. coli* ST, термостабильный энтеротоксин *E. coli* (ST), эритрогенный токсин, токсин эксфолиатина, экзотоксин А, энтеротоксин *Perfringens*, токсин коклюша (РТ, Ptx), шига-токсин (ST, Stx), субъединицу В шига-токсина (STB, StxB), шига-подобный токсин, энтеротоксины *Staphylococcus*, столбнячный токсин (ТТ), токсин синдрома токсического шока (TSST-1), веро-токсин (VT), токсин А (ТА) и токсин В (ТВ) *Clostridium difficile*, летальный токсин (LT) и геморрагический токсин (HT) из *Clostridium sordellii* и α -токсин (AT) из *Clostridium novyi*.

8. Микроорганизм по п.1, в котором первый и второй компоненты связаны друг с другом с облегчением экспрессии и/или секреции слитого белка, кодируемого обоими вышеуказанными компонентами.

9. Микроорганизм по п.8, в котором слитый белок выбран из группы, включающей CtxB-PSA, CtxB-B-RafV600E KD, CtxB-домен киназы B-RafV600E, CtxB-домен киназы KD B-Raf V600E, CtxB-B-Raf, CtxB-B-Raf KD, CtxB домен киназы KD B-Raf, CtxB-HA1 и CtxB-HA12C.

10. Микроорганизм по п.1, в котором первый подкомпонент выбран из группы, включающей систему секреции типа I, систему секреции типа II, систему секреции типа III, систему секреции типа IV, систему секреции типа V, гемолизиновую систему транспорта (сигнал) *Escherichia coli* (нуклеотидные последовательности, включающие HlyA, HlyB и HlyD под контролем hly-специфического промотора), гемолизиновую систему транспорта (сигнал) *Escherichia coli* (нуклеотидные последовательности, включающие HlyA, HlyB и HlyD под контролем не-hly-специфического бактериального промотора), транспортный сигнал для белка S-слоя (Rsa A) *Caulobacter crescentus*, транспортный сигнал для белка TolC *Escherichia coli*, сигнал секреции Vtgss и сигналы секреции, выделенные из листериолизина, р60 и/или ActA, а второй подкомпонент выбран из группы, включающей эндолизины, литический белок грамположительных бактерий, литический белок *Listeria monocytogenes*, PLY551 *Listeria monocytogenes* и холин *Listeria monocytogenes*.

11. Микроорганизм по п.10, в котором первый подкомпонент представляет собой по меньшей мере одну нуклеотидную последовательность, кодирующую только одну транспортную систему, которая облегчает сопутствующую экспрессию продуктов экспрессии первого и второго компонентов на наружной поверхности микроорганизма и/или облегчает сопутствующую секрецию продуктов экспрессии первого и второго компонентов, и по меньшей мере одну нуклеотидную последовательность, кодирующую гемолизиновую транспортную систему (сигнал) *Escherichia coli* (нуклеотидные последовательности, включающие HlyA, HlyB и HlyD под контролем hly-специфического промотора) или гемолизиновую транспортную систему (сигнал) *Escherichia coli* (нуклеотидные последовательности, включающие HlyA, HlyB и HlyD под контролем не-hly-специфического бактериального промотора).

12. Микроорганизм по п.1, в котором в присутствии первого подкомпонента секретируются продукты экспрессии первого и второго компонентов.

13. Микроорганизм по п.1, в котором первый компонент выбран из группы,

включающей B-RafV600E, домен киназы B-RafV600E, B-RafV600E KD, домен киназы KD B-RafV600E, B-Raf KD, домен киназы B-Raf, домен киназы KD B-Raf, простата-специфический антиген (PSA), гемагглютинин HA1 (предпочтительно из вируса гриппа A (A/Thailand/1(KAN-1)2004(H5N1))), гемагглютинин HA 12 (предпочтительно из вируса гриппа A (A/Thailand/1(KAN-1)2004(H5N1))), гемагглютинин HA12C (предпочтительно из вируса гриппа A (A/Thailand/1(KAN-1)2004(H5N1))), второй компонент выбран из группы, включающей субъединицу В холерного токсина (СТВ, СtxB), субъединицу В термоллабильного энтеротоксина E. coli (LTB), столбнячный токсин (ТТ), первый подкомпонент выбран из группы, включающей сигнал гемолизинового транспорта HlyA Escherichia coli вместе с компонентами системы секреции Hly (нуклеотидными последовательностями, включающими HlyA, HlyB и HlyD под контролем hly-специфического промотора), четвертый компонент выбран из группы, включающей эндогенный промотор локуса hly E. coli, при этом первый и второй компоненты связаны друг с другом с облегчением экспрессии секретируемого слитого белка, кодируемого обоими вышеуказанными компонентами.

14. Фармацевтическая композиция для стимулирования иммунного ответа, включающая по меньшей мере один микроорганизм, предпочтительно в лиофилизированной форме, по любому из пп.1-13 и фармацевтически приемлемый носитель предпочтительно в виде капсулы.

15. Лекарственное средство для стимулирования иммунного ответа, включающее по меньшей мере один микроорганизм по любому из пп.1-13 или по меньшей мере одну фармацевтическую композицию по п.14.

16. Применение микроорганизма по любому из пп.1-13 для приготовления лекарственного средства для лечения и/или профилактики физиологических и/или патофизиологических состояний, выбранных из группы, включающей неконтролируемое деление клеток, злокачественные опухоли, доброкачественные опухоли, солидные опухоли, саркому, карциному, гиперпролиферативные нарушения, карциноиды, саркому Эвинга, саркому Капоши, опухоли головного мозга, опухоли, происходящие из головного мозга, и/или нервной системы, и/или мозговых оболочек, глиом, нейробластомы, рак желудка, рак почки, карциному почечных клеток, рак простаты, карциному простаты, опухоли соединительных тканей, саркому мягких тканей, опухоли поджелудочной железы, опухоли печени, опухоли головы, опухоли шеи, рак пищевода, рак щитовидной железы, остеосаркому, ретинобластому, тимому, рак яичка, рак легкого, бронхиальные карциномы, рак молочной железы, карциному молочной железы, рак кишки, колоректальные опухоли, карциному толстой кишки, карциному прямой кишки, гинекологические опухоли, опухоли яичника/овариальные опухоли, рак матки, рак шейки матки, карциному шейки матки, рак тела матки, карциному тела, эндометриальные карциномы, рак мочевого пузыря, рак полости, рак кожи, базалиому, спиналиому, меланому, внутриглазные меланомы, лейкоз, хронический лейкоз, острый лейкоз, лимфому, инфекцию, вирусную или бактериальную инфекцию, грипп, хроническое воспаление, отторжение органа и аутоиммунные заболевания.

17. Экспрессионная плаزمид, включающая первый, второй третий и четвертый компоненты микроорганизма по любому из пп.1-13.

18. Способ получения микроорганизма по любому из пп.1-13, в котором получают экспрессионную плазмиду по п.17, а затем трансформируют

микроорганизм данной плазмидой.

19. Вектор экспрессии, включающий первый, второй, третий и четвертый компоненты микроорганизма по любому из пп.1-13.

5 20. Способ получения микроорганизма по любому из пп.1-13, в котором получают вектор экспрессии по п.19, а затем трансформируют микроорганизм данным вектором экспрессии.

10 21. Фармацевтический набор для стимулирования иммунного ответа, включающий по меньшей мере один микроорганизм по любому из пп.1-13 или фармацевтическую композицию по п.14, или лекарственное средство по п.15 и фармакологически приемлемый буфер, предпочтительно карбонатный буфер.

15

20

25

30

35

40

45

50

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> Этерна Центарис ГмбХ

<120> Микроорганизм-носитель нуклеотидных последовательностей, кодирующих антигены и белковые токсины, содержащие его фармацевтическая композиция, фармацевтический набор, лекарственное средство, плазмида и вектор экспрессии, способ получения указанного микроорганизма и способ лечения и/или профилактики физиологических и/или патофизиологических состояний с его использованием

<130> РСТ 06/02 Z

<140> РСТ/ЕР2007/062237

<141> 2007-11-13

<150> ЕР 06123974.5

<151> 2006-11-13

<150> US 60/939,140

<151> 2007-05-21

<150> US 60/865,484

<151> 2006-11-13

<160> 40

<170> PatentIn Версия 3 3

<210> 1

<211> 61

<212> ДНК

<213> Искусственная

<220>

<223> Искусственная ДНК последовательность

<400> 1

gagtattcaa catttccgtg tcgcccttat tccctttttt ggtgtaggct ggagctgctt 60

c 61

<210> 2

<211> 60

<212> ДНК

<213> Искусственная

<220>

<223> Искусственная ДНК последовательность

<400> 2

gcgatctgtc tatttcgttc atccatagtt gcctgactcc ccatatgaat atcctcctta 60

<210> 3

<211> 21

<212> ДНК

<213> Искусственная

<220>

<223> Искусственная ДНК последовательность

<400> 3

gattgggtgat gcatccctca t 21

<210> 4

<211> 21

<212> ДНК

<213> Искусственная

<220>

<223> Искусственная ДНК последовательность

<400> 4

ggtgctcatg cattggccac g 21

<210> 5

<211> 37

<212> ДНК

<213> Искусственная

<220>

<223> Искусственная ДНК последовательность

<400> 5

aaaaaagtcg acggctgtgc aggtcgtaaa tcaactgc 37

<210> 6

<211> 39

<212> ДНК

<213> Искусственная

<220>

<223> Искусственная ДНК последовательность

<400> 6

aaaaaagcgg ccgcgaaatt gttatccgct cacaattcc

39

<210> 7

<211> 46

<212> ДНК

<213> Искусственная

<220>

<223> Искусственная ДНК последовательность

<400> 7

aaaaaagcgg ccgcstaagga tgaattatga ttaaattaaa atttgg

46

<210> 8

<211> 42

<212> ДНК

<213> Искусственная

<220>

<223> Искусственная ДНК последовательность

<400> 8

tttatagtcg acttaatttg ccataactaat tgcggcaatc gc

42

<210> 9

<211> 36

<212> ДНК

<213> Искусственная

<220>

<223> Искусственная ДНК последовательность

<400> 9

gcatatgcac atgcatcacc tcaaaatatt actgat

36

<210> 10

<211> 44

<212> ДНК

<213> Искусственная

<220>

<223> Искусственная ДНК последовательность

<400> 10

ggcttttttta tatcttatgc atgcccgggc attgcggaac tcgc

44

<210> 11

<211> 18

<212> ДНК

<213> Искусственная

<220>

<223> Искусственная ДНК последовательность

<400> 11

gtgggaggct gggagtgc

18

<210> 12

<211> 18

<212> ДНК

<213> Искусственная

<220>

<223> Искусственная ДНК последовательность

<400> 12

gggggtggcc acgatggt

18

<210> 13

<211> 29

<212> ДНК

<213> Искусственная

<220>

<223> Искусственная ДНК последовательность

<400> 13

catgtatgca ttagccatgg tatasctgg

29

<210> 14

<211> 33

<212> ДНК

<213> Искусственная

<220>

<223> Искусственная ДНК последовательность

<400> 14

ttttttatgc ataagggaaa caccacatct gcc

33

<210> 15

<211> 18

<212> ДНК

<213> Искусственная

<220>

<223> Искусственная ДНК последовательность

<400> 15

gccatcatgt cagctcta

18

<210> 16

<211> 18

<212> ДНК

<213> Искусственная

<220>

<223> Искусственная ДНК последовательность

<400> 16

aggggaaaca catctgcc

18

<210> 17

<211> 18

<212> ДНК

<213> Искусственная

<220>

<223> Искусственная ДНК последовательность

<400> 17

atctgtcaaa tggagaaa

18

<210> 18

<211> 21

<212> ДНК

<213> Искусственная

<220>

<223> Искусственная ДНК последовательность

<400> 18

tactccactt atttcctctc t

21

<210> 19

<211> 87

<212> ДНК

<213> Искусственная

<220>

<223> Искусственная ДНК последовательность

<400> 19

ctgaattcat gaaaatatca tcatttat tttt ctacatcaact gcccctgccg gcatcagtg

60

caaataaagt aaaatgttat gttttat

87

<210> 20

<211> 32

<212> ДНК

<213> Искусственная

<220>

<223> Искусственная ДНК последовательность

<400> 20

gttttccata ctgattgccg caattgaatt gg	32
<210> 21	
<211> 21	
<212> ДНК	
<213> Искусственная	
<220>	
<223> Искусственная ДНК последовательность	
<400> 21	
gtgggaggct gggagtgcga g	21
<210> 22	
<211> 32	
<212> ДНК	
<213> Искусственная	
<220>	
<223> Искусственная ДНК последовательность	
<400> 22	
cctgaattct tagacgtgat accttgaagc ac	32
<210> 23	
<211> 23	
<212> ДНК	
<213> Искусственная	
<220>	
<223> Искусственная ДНК последовательность	
<400> 23	
taaaaatctg gattgttggg ttg	23
<210> 24	
<211> 23	
<212> ДНК	
<213> Искусственная	
<220>	

<223> Искусственная ДНК последовательность

<400> 24

atcatttgtc catccttcat ctg

23

<210> 25

<211> 19

<212> ДНК

<213> Искусственная

<220>

<223> Искусственная ДНК последовательность

<400> 25

gattgggaga ttcctgatg

19

<210> 26

<211> 21

<212> ДНК

<213> Искусственная

<220>

<223> Искусственная ДНК последовательность

<400> 26

cccgtggaca ggaacgcac c

21

<210> 27

<211> 33

<212> ДНК

<213> Искусственная

<220>

<223> Искусственная ДНК последовательность

<400> 27

atcggatcct caaaatatta ctgatttggtg tgc

33

<210> 28

<211> 36

<212> ДНК

<213> Искусственная

<220>

<223> Искусственная ДНК последовательность

<400> 28

tagggatcct tagtggacag gaaacgcacc atatcc 36

<210> 29

<211> 285

<212> ДНК

<213> Искусственная

<220>

<223> Искусственная ДНК последовательность

<400> 29

atgccaaaca taaccactgc acaaattaaa agcacactgc agtctgcaaa gcaatccgct 60

gcaaataaat tgcactcagc aggacaaagc acgaaagatg cattagccta tggaagtcag 120

ggtgatctta atccattaat taatgaaatc agcaaaatca tttcagctgc aggtagcttc 180

gatgttaaag aggaaagaac tgcagcttct ttattgcagt tgtccggtaa tgccagtgat 240

ttttcatatg gacggaactc aataaccctg accacatcag cataa 285

<210> 30

<211> 2124

<212> ДНК

<213> Искусственная

<220>

<223> Искусственная ДНК последовательность

<400> 30

atggattcctt gtcataaaat tgattatggg ttatacgccc tggagatttt agcccaatac 60

cataacgtct ctgttaaccc ggaagaaatt aaacatagat ttgatacaga cgggacaggt 120

ctgggattaa cgtcatgggt gcttgctgctg aaatcttttag aactaaaggt aaaacaggta 180

aaaaaaaca ttgatcgatt aaactttatt tttctgcccg cattagtctg gagagaggat 240

ggacgtcatt ttattctgac taaaatcagc aaagaagtaa acagatatct tatttttgat 300

ttggagcagc gaaatccccg tgttctcgaa cagtctgagt ttgaggcggt atatcagggg 360

catattatttc ttattacttc ccgttcttct gttaccggga aactggcaaa atttgacttt	420
acctggttta ttcctgccat tataaaatac aggagaatat ttattgaaac ccttggtgta	480
tctgtttttt tacaattatt tgcattaata accccccttt tttttcaggt ggttatggac	540
aaagtattag tgcacagggg gttttcaacc cttaatgtta ttactggtgc cttatctggt	600
gtagtggtgt ttgagattat actcagcggg ttaagaactt acatttttgc acatagtaca	660
agtcggattg atgttgagtt ggggtgcaaa ctcttcgggc atttactggc gctaccgatc	720
tcttattttt agagtcgctc tgttggtgat actggtgcga gggtaagaga attagaccag	780
atccgtaatt ttctgacagg acaggcatta acatctgttt tggacttatt attttcttc	840
atattttttt cggtaatgtg gtattacagc ccaaagctta ctctgggtgat cttatttttcg	900
ctgccttggt atgctgcatg gtctgttttt attagcccca ttttgcgacg tcgccttgat	960
gataagtttt cacggaatgc ggataatcaa tctttcctgg tggaatcagt aacggcgatt	1020
aacactataa aagctatggc agtctcacct cagatgacga acatatggga caaacaattg	1080
gcaggatatg ttgctgcagg ctttaaagtg acagtattag caaccattgg tcaacaagga	1140
atacagttaa tacaaaagac tggtatgatc atcaacctat ggttgggagc acacctgggt	1200
atttccgggg atttaagtat tggtcagtta attgctttta atatgcttgc tggtcagatt	1260
gttgccaggg ttattcgctc tgcacaaatc tggcaggatt tccagcaggg tggatatatca	1320
gttaccgcc ttggtgatgt gcttaactct ccaactgaaa gttatcatgg gaaactgaca	1380
ttgccggaaa ttaatgggtga tatcaacttt cgtaatatcc ggtttcgcta taaacctgat	1440
tctccgggta ttttggacaa tatcaatctt agtattaagc agggggaggg tattgggtatt	1500
gtcggacggt ctggttcagg aaaaagcaca ttaactaaat taattcaacg tttttatatt	1560
cctgaaaatg gccagggtatt aattgatgga catgatcttg cgttggccga tcctaactgg	1620
ttacgtcgtc aggtgggggt tgtgttgagc gacaatgtgc tgcttaatcg cagtattatt	1680
gataatattt cactggctaa tcctggcatg tccgtcgaaa aagttattta tgcagcgaaa	1740
ttagcagggt ctcattgattt tattttctgaa ttgcgtgagg ggtataaacac cattgtcggg	1800
gaacaggggg caggattatc cggagggtcaa cgtcaacgca tcgcaattgc aagggcgctg	1860
gtgaacaacc ctaaaatact catTTTTgat gaagcaacca gtgctctgga ttatgagtcg	1920
gagcatgtca tcatgcgcaa tatgcacaaa atatgtaagg gcagaacggg tataatcatt	1980
gtcatcgtc tgtctacagt aaaaaatgca gaccgcatta ttgtcatgga aaaagggaaa	2040
attggtgaac agggtaaaca taaggagctg ctttctgaac cggaaagttt atacagttac	2100
ttatatcagt tacagtcaga ctaa	2124

<210> 31

<211> 1437

<212> ДНК

<213> Искусственная

<220>

<223> Искусственная ДНК последовательность

<400> 31

```

atgaaaacat ggttaatggg gttcagcgag ttcctgttgc gctataaact tgtctggagt      60
gaaacatgga aaatccggaa gcaattagat actccggtac gtgaaaagga cgaaaatgaa    120
ttcttaccgg ctcatctgga attaatgaa acgccagtat ccagacggcc gcgtctgggt      180
gcttattttta ttatgggggt tctgggttatt gcttttattt tatctgtttt aggccaagtg    240
gaaattgttg ccactgcaaa tgggaaatta acacacagtg ggcgtagtaa agaaattaaa      300
cctattgaaa actcaatagt taaagaaatt atcgtaaaag aaggagagtc agtccggaaa      360
ggggatgtgt tattaaagct tacagcactg ggagctgaag ctgatacggt aaaaacacag      420
tcatcactgt tacaggccag gctggaacaa actcggtatc aaattctgag caggtcaatt      480
gaattaaata aactacctga actaaagctt cctgatgagc cttattttca gaatgtatct      540
gaagaggaag tactgcgttt aacttctttg ataaaagaac agttttccac atggcaaaat      600
cagaagtatc aaaaagaact gaatttggat aagaaaagag cagagcgatt aacagtactt      660
gcccgataaa accgttatga aaatttatca agggttgaaa aaagccgtct ggatgatttc      720
agtagtttat tgcataaaca ggcaattgca aaacatgctg tacttgagca ggagaataaa      780
tatgtcgaag cagtaaataga attacgagtt tataaatcac aactggagca aattgagagt      840
gagatattgt ctgcaaaaga agaatatcag cttgttacgc agctttttta aaatgaaatt      900
ttagataagc taagacaaac cacagacaac attggggttat taactctgga attagcgaaa      960
aatgaagagc gtcaacaggc ttcagtaatc agggccccag tttcggtaaa agttcagcaa    1020
ctgaagggtc atactgaagg tgggggttgtt acaacagcgg aaacactgat ggtcatcggt    1080
ccggaagatg acacgctgga gggttactgct ctggtacaaa ataaagatat tgggttttatt    1140
aacgtcgggc agaatgccat cattaaagtg gaggcatttc cttatacacg atatggttat    1200
ctggtgggta aggtgaaaaa tataaattta gatgcaatag aagaccagag actgggactt    1260
gttttttaatg ttattatttc tattgaagag aattgtttgt caaccggaaa taaaaacatt    1320
ccattaagct cgggtatggc agtcactgca gaaataaaga caggtatgcg aagtgtaatc    1380
agttatcttc ttagtccttt agaagagtca gtaacagaaa gtttacgtga gcgttaa      1437

```

<210> 32

<211> 708

<212> ДНК

<213> Искусственная

<220>

<223> Искусственная ДНК последовательность

<400> 32

```

gtgggaggct gggagtgcga gaagcattcc caaccctggc aggtgcttgt ggcctctcgt      60
ggcagggcag tctgcgggcg tgttctggtg cccccccagt gggtcctcac agctgcccac      120
tgcatcagga acaaaagcgt gatottgctg ggtcggcaca gcctgtttca tcctgaagac      180
acaggccagg tatttcaggt cagccacagc ttcccacacc cgctctacga tatgagcctc      240
ctgaagaatc gattcctcag gccaggatgat gactccagcc acgacctcat gctgctccgc      300
ctgtcagagc ctgccgagct cacggatgct gtgaagggtca tggacctgcc caccaggag      360
ccagcactgg ggaccacctg ctacgcctca ggctggggca gcattgaacc agaggagttc      420
ttgaccccaa agaaacttca gtgtgtggac ctccatgtta tttccaatga cgtgtgtgcg      480
caagtccacc ctcagaaggt gaccaagttc atgctgtgtg ctggacgctg gacagggggc      540
aaaagcacct gctcgggtga ttctgggggc ccacttgtct gtaatgggtg gcttcaaggt      600
atcacgtcat ggggcagtg accatgtgcc ctgcccgaag ggccttcctt gtacaccaag      660
gtggtgcatt accggaagtg gatcaaggac accatcgtgg ccaacccc      708

```

<210> 33

<211> 291

<212> ДНК

<213> Искусственная

<220>

<223> Искусственная ДНК последовательность

<400> 33

```

cctcaaaaata ttactgattt gtgtgcagaa taccacaaca cacaaatata tacgctaaat      60
gataagatat tttcgtatac agaattctta gctggaaaaa gagagatggc tatcattact      120
tttaagaatg gtgcaatttt tcaagtagaa gtaccaggta gtcaacatat agattcacaa      180
aaaaaagcga ttgaaaggat gaaggatacc ctgaggattg catatcttac tgaagctaaa      240
gtcgaaaagt tatgtgtatg gaataataaa acgcctcatg cgattgccgc a      291

```

<210> 34

<211> 927

<212> ДНК

<213> Искусственная

<220>

<223> Искусственная ДНК последовательность

<400> 34

gatgattggg agattcctga tgggcagatt acagtgggac aaagaaaggg aaagtggcat	60
ggtgatgtgg cagtgaaaat gttgaatgtg acagcaccta cacctcagca gttacaagcc	120
ttcaaaaatg aagtaggagt actcaggaaa acacgacatg tgaatatcct actcttcag	180
ggctattcca caaagccaca actggctatt gttaccaggt ggtgtgaggg ctccagcttg	240
tatcaccatc tccatatcat tgagaccaa tttgagatga tcaaacttat agatattgca	300
cgacagactg cacagggcat ggattactta cagccaagt caatcatcca cagagacctc	360
aagagtaata atatatttct tcatgaagac ctcacagtaa aaataggtga ttttgggtcta	420
gctacagaga aatctcgatg gagtgggtcc catcagtttg aacagttgtc tggatccatt	480
ttgtgggatg caccagaagt catcagaatg caagataaaa atccatacag ctttcagtca	540
gatgtatatg catttgggat tgttctgtat gaattgatga ctggacagtt accttattca	600
aacatcaaca acagggacca gataatTTTT atggtgggac gaggatacct gtctccagat	660
ctcagtaagg tacggagtaa ctgtccaaaa gccatgaaga gattaatggc agagtgcctc	720
aaaaagaaaa gagatgagag accactcttt ccccaaattc tcgcctctat tgagctgctg	780
gcccgtcat tgccaaaaat tcaccgcagt gcatcagaac cctccttgaa tcgggctggt	840
ttccaaacag aggatttttag tctatatgct tgtgcttctc caaaaacacc catccaggca	900
gggggatatg gtgcgtttcc tgtccac	927

<210> 35

<211> 92

<212> ДНК

<213> Искусственная

<220>

<223> Искусственная ДНК последовательность

<400> 35

cgattttggc ctggcgaccg aaaaagcggg cgattttggc ctggcgaccg aaaaagcggg	60
cgattttggc ctggcgaccg aaaaagcggg gc	92

<210> 36

<211> 1302

<212> ДНК

<213> Искусственная

<220>

<223> Искусственная ДНК последовательность

<400> 36

```

atgccaacaa taaccactgc acaaattaaa agcacactgc agtctgcaaa gcaatccgct      60
gcaaataaat tgcactcagc aggacaaagc acgaaagatg catcacctca aaatattact      120
gatttgtgtg cagaatacca caacacacaa atatatacgc taaatgataa gatattttcg      180
tatacagaat ctctagctgg aaaaagagag atggctatca ttacttttaa gaatgggtgca      240
atTTTTcaag tagaagtacc aggtagtcaa catatagatt cacaaaaaaa agcgattgaa      300
aggatgaagg ataccttgag gattgcatat cttactgaag ctaaagtcga aaagttatgt      360
gtatggaata ataaaacgcc tcatgcgatt gccgcaatgc cctggggagg ctggggagtgc      420
gagaagcatt cccaaccctg gcaggtgctt gtggcctctc gtggcagggc agtctgcggc      480
gggtgttctg tgcaccccca gtgggtcctc acagctgccc actgcatcag gaacaaaagc      540
gtgatcttgc tgggtcggca cagcctgttt catcctgaag acacaggcca ggtatttcag      600
gtcagccaca gcttcccaca cccgctctac gatatgagcc tcctgaagaa tcgattcctc      660
agggcagggtg atgactccag ccacgacctc atgctgctcc gcctgtcaga gcctgccgag      720
ctcacggatg ctgtgaaggt catggacctg cccaccagg agccagcact ggggaccacc      780
tgctacgcct caggctgggg cagcattgaa ccagaggagt tcttgacccc aaagaaactt      840
cagtgtgtgg acctccatgt tatttccaat gacgtgtgtg cgcaagttca ccctcagaag      900
gtgaccaagt tcatgctgtg tgctggacgc tggacagggg gcaaaagcac ctgctcgggt      960
gattctgggg gccacttgt ctgtaatggt gtgcttcaag gtatcacgtc atggggcagt     1020
gaaccatgtg ccctgcccga aaggccttcc ctgtacacca aggtgggtgca ttaccggaag     1080
tggatcaagg acaccatcgt ggccaacccc gggcatgcat tagcctatgg aagtcagggt     1140
gatcttaatc cattaattaa tgaaatcagc aaaatcattt cagctgcagg tagcttcgat     1200
gttaaagagg aaagaactgc agcttcttta ttgcagttgt ccggtaatgc cagtgatttt     1260
tcatatggac ggaactcaat aaccctgacc acatcagcat aa                               1302

```

<210> 37

<211> 684

<212> ДНК

<213> Искусственная

<220>

<223> Искусственная ДНК последовательность

<400> 37

```

atgacaacaa taaccactgc acaaattaaa agcacactgc agtctgcaaa gcaatccgct      60
gcaaataaat tgcactcagc aggacaaagc acgaaagatg catcacctca aaatattact      120
gatttgtgtg cagaatacca caacacacaa atacatacgc taaatgataa gatattttcg      180
tatacagaat ctctagctgg aaaaagagag atggctatca ttacttttaa gaatgggtgca      240
acttttcaag tagaagtacc aggtagtcaa catatagatt cacaaaaaaa agcgattgaa      300

```

aggatgaagg ataccctgag gattgcatat cttactgaag ctaaagtcga aaagttatgt 360
gtatggaata ataaaacgcc tcatgcgatt gccgcaatgc cggcgattt tggcctggcg 420
accgaaaaag cgggcgattt tggcctggcg accgaaaaag cgggcgattt tggcctggcg 480
accgaaaaag cggggcgatgc attagcctat ggaagtcagg gtgatcttaa tccattaatt 540
aatgaaatca gcaaaatcat ttcagctgca ggtagcttcg atgttaaaga ggaaagaact 600
gcagcttctt tattgcagtt gtccggtaat gccagtgatt tttcatatgg acggaactca 660
ataaccctga ccacatcagc ataa 684

<210> 38

<211> 1521

<212> ДНК

<213> Искусственная

<220>

<223> Искусственная ДНК последовательность

<400> 38

atgccaaaca taaccactgc acaaattaaa agcacactgc agtctgcaaa gcaatccgct 60
gcaaataaat tgcaactcagc aggacaaagc acgaaagatg catcacctca aaatattact 120
gatttgtgtg cagaatacca caacacacaa atatatacgc taaatgataa gatattttcg 180
tatacagaat ctctagctgg aaaaagagag atggctatca ttacttttaa gaatggtgca 240
atttttcaag tagaagtacc aggtagtcaa catatagatt cacaaaaaaa agcgattgaa 300
aggatgaagg ataccctgag gattgcatat cttactgaag ctaaagtcga aaagttatgt 360
gtatggaata ataaaacgcc tcatgcgatt gccgcaatgc ccgatgattg ggagattcct 420
gatgggcaga ttacagtggg acaaagaaag ggaaagtggc atgggtgatgt ggcagtgaaa 480
atgttgaatg tgacagcacc tacacctcag cagttacaag ccttcaaaaa tgaagtagga 540
gtactcagga aaacacgaca tgtgaatatc ctactcttca tgggctattc cacaaagcca 600
caactgggcta ttgttaccga gtggtgtgag ggctccagct tgtatcacca tctccatatt 660
attgagacca aatttgagat gatcaaactt atagatattg cacgacagac tgcacagggc 720
atggattact tacacgccaa gtcaatcatt cacagagacc tcaagagtaa taatatattt 780
cttcatgaag acctcacagt aaaaataggt gattttgggtc tagctacaga gaaatctcga 840
tggagtgggt cccatcagtt tgaacagttg tctggatcca ttttgtggat ggcaccagaa 900
gtcatcagaa tgcaagataa aaatccatac agctttcagt cagatgtata tgcatttggg 960
attgttctgt atgaattgat gactggacag ttaccttatt caaacatcaa caacagggac 1020
cagataattt ttatgggtggg acgaggatac ctgtctccag atctcagtaa ggtacggagt 1080
aactgtccaa aagccatgaa gagattaatg gcagagtgcc tcaaaaagaa aagagatgag 1140
agaccactct tccccaaat tctcgctctt attgagctgc tggcccgcctc attgccaaaa 1200

attcacccgca gtgcatcaga accctccttg aatcgggctg gtttccaaac agaggatttt 1260
 agtctatatg cttgtgcttc tccaaaaaca cccatccagg cagggggata tgggtgcgttt 1320
 cctgtccacg ggcattgcatt agcctatgga agtcagggtg atcttaatcc attaattaat 1380
 gaaatcagca aaatcatttc agctgcaggt agcttcgatg ttaaagagga aagaactgca 1440
 gcttctttat tgcagttgtc cggtaatgcc agtgattttt catatggacg gaactcaata 1500
 accctgacca catcagcata a 1521

<210> 39

<211> 2169

<212> ДНК

<213> Искусственная

<220>

<223> Искусственная ДНК последовательность

<400> 39

atgacaaca taaccactgc acaaattaaa agcacactgc agtctgcaaa gcaatccgct 60
 gcaaataaat tgcactcagc aggacaaagc acgaaagatg catcacctca aaatattact 120
 gatttgtgtg cagaatacca caacacacaa atacatacgc taaatgataa gatattttcg 180
 tatacagaat ctctagctgg aaaaagagag atggctatca ttacttttaa gaatgggtgca 240
 actttttcaag tagaagtacc aggtagtcaa catatagatt cacaaaaaaa agcgattgaa 300
 aggatgaagg ataccctgag gattgcatat cttactgaag ctaaagtcga aaagttatgt 360
 gtatggaata ataaaacgcc tcatgcgatt gccgcaatgc ccatctgtca aatggagaaa 420
 atagtgcctc tttttgcaat agtcagtctt gttaaaagtg atcagatttg cattgggttac 480
 catgcaaaca actcgacaga gcagggtgac acaataatgg aaaagaacgt tactgttaca 540
 catgccaag acatactgga aaagacacac aacgggaagc tctgcgatct agatggagtg 600
 aagcctctaa ttttgagaga ttgtagtgtg gctggatggc tcctcggaac cccaatgtgt 660
 gacgaattca tcaatgtgcc ggaatgggtc tacatagtgg agaaggccaa tccagtcaat 720
 gacctctgtt acccagggga tttcaatgac tatgaagaat tgaaacacct attgagcaga 780
 ataaaccatt ttgagaaaat tcagatcatc cccaaaagtt cttgggtccag tcatgaagcc 840
 tcattagggg tgagctcagc atgtccatac cagagaaagt cctccttttt cagaaatgtg 900
 gtatggctta tcaaaaagaa cagtacatac ccaacaataa agaggagcta caataatacc 960
 aaccaagaag atcttttggg actgtggggg attcaccatc ctaatgatgc ggcagagcag 1020
 acaaagctct atcaaaacc aaccacctat atttccgttg ggacatcaac actaaaccag 1080
 agattggtag caagaatagc tactagatcc aaagtaaagc ggcaaagtgg aaggatggag 1140
 ttcttctgga caatttttaa accgaatgat gcaatcaact tcgagagtaa tggaaatttc 1200
 attgctccag aatatgcata caaaattgtc aagaaagggg actcaacaat tatgaaaagt 1260

gaattggaat atggtaactg caacaccaag tgtcaaactc caatgggggc gataaactct	1320
agtatgccat tccacaatat acaccctctc accatcgggg aatgccccaa atatgtgaaa	1380
tcaaacagat tagtccttgc gactgggctc agaaatagcc ctcaaagaga gagaagaaga	1440
aaaaagagag gattatattg agctatagca ggttttatag agggaggatg gcagggaatg	1500
gtagatgggtt ggtatgggta ccaccatagc aatgagcagg ggagtgggta cgctgcagac	1560
aaagaatcca ctcaaaaggc aatagatgga gtcaccaata aggtcaactc gatcattgac	1620
aaaatgaaca ctcagtttga ggccggttga agggaattta acaacttaga aaggagaata	1680
gagaatttaa acaagaagat ggaagacggg ttcctagatg tctggactta taatgctgaa	1740
cttctgggttc tcatggaaaa tgagagaact ctagactttc atgactcaa tgtcaagaac	1800
ctttacgaca aggtccgact acagcttagg gataatgcaa aggaactggg taacggttgt	1860
ttcgagttct atcataaatg tgataatgaa tgtatggaaa gtgtaagaaa cggaacgtat	1920
gactaccgc agtattcaga agaagcaaga ctaaaaagag aggaaataag tggagtaggg	1980
catgcattag cctatggaag tcagggtgat cttaatccat taattaatga aatcagcaaa	2040
atcattttcag ctgcaggtag cttcgatggt aaagaggaaa gaactgcagc ttctttattg	2100
cagttgtccg gtaatgccag tgatttttca tatggacgga actcaataac cctgaccaca	2160
tcagcataa	2169

<210> 40

<211> 12672

<212> ДНК

<213> Искусственная

<220>

<223> Искусственная ДНК последовательность

<400> 40

gaattccaag cgaagtccat cccctccct cttgattaca agggtgataa ttattattcg	60
catttggtg gtaatgggat agaaaggaat ggatagaaaa agaacaaaat tagtatagca	120
atagatatgc ccactgcatt gaatacttac agggcattat ttattatgt ttaaattgaa	180
gtggctctctg gtttgattta ttgtttatc aagggggctg tttggagatc ggaaaattct	240
gtacgttaag tgtattattt aaccagtttc gatgcgtaac agattgattt tgcgtcagcg	300
gttatcgctt ttaagttgtt gctcttgccg tatcgcggtt aggttatccg attaaagtca	360
aatttcctga aaatgctgta tagcgcgga gtgcacctta tagctgtagg taagtatgtt	420
caaaaaatag tcttgccgta caataatttt ccatatccaa actcactcct tcaagattct	480
ggccccggtt tacgggtagt ttccggaagg gcggtagcat gctgattcaa actgcaagat	540
gaaacattgt cggagttgga tggaattaag tcatggctat agcatttggg cgtgcataac	600
aaaattggtc ctcataattt agagtatgat tgcataattca ctaataattt tactttctga	660

tgcgtggtgg	catcatgctt	tatgagataa	acaatcctgg	tagactagcc	ccctgaatct	720
ccagacaacc	aatatcactt	atttaagtga	tagtcttaat	actagttttt	agactagtca	780
ttggagaaca	gatgattgat	gtcttaggat	cggagaaacg	cagacggcgt	actacacagg	840
aaaagatcgc	tatcgttcag	cagagctttg	aaccgggaat	gacggtctcc	cttgttgccc	900
ggcaacatgg	tgtggcagcc	agccagctat	ttctctggcg	caagcaatac	caggagggaa	960
gtcttactgc	tgtggctgcc	ggagaacagg	tcgttctctgc	ctctgaactt	gctgccgccca	1020
tgaagcagat	taaagagctc	cagcgcttgc	tcggcaaaaa	aacgatggaa	aatgaactcc	1080
ttaaagaagc	cgttgaatat	gggcgagcaa	aaaagtggat	agcgcacgcg	cccttattgc	1140
ccggggatgg	ggagtaagct	tcgtcagccg	ttgtctccgg	gtgtcgcgtg	cgcagttgca	1200
cgtcattctc	agacgaaccg	atgactggaa	ggacggccgc	cgcagccgtc	acacgggatga	1260
tacggatgtg	cttcgccgta	tacatcatgt	tatcggagag	ctgcccacat	atggttatcg	1320
tcgggtatgg	gcgctgcttc	gcagacaaac	agaacttgat	ggatgcctg	cgatcaatgc	1380
caaagtgtgt	taccggatca	tgtgccagaa	tcgctgtgtg	cttgagcgaa	aaccgcgtgt	1440
accgccatcg	aaacgggcac	ataccggcag	agtggctgtg	aaagaaagta	atcagcgatg	1500
gtgctctgac	gggtttgagt	tccgctgtga	taacggagaa	aaactgcggg	tcacgttcgc	1560
gctggactgc	tgtgatcggt	aggcactgca	ctgggcgggtc	acaacgggtg	gcttcaacag	1620
tgaaacagta	caggacgtca	tgctgggagc	agtggaacgc	cgctttggca	gcgagcttcc	1680
ggcgtctcca	gtggagtggc	tgacggataa	tggttcatgc	taccgggcca	atgaaacacg	1740
tcagttcgcc	aggatgttgg	gacttgaacc	gaagaacacg	gcagtgcgga	gtccggagag	1800
taacggaata	acagagagct	tcgtgaaaac	gataaagcgt	gattacataa	gtatcatgcc	1860
caaaccagac	gggttaacgg	cagcaaagaa	ccttgacagag	gcgttcgagc	attataacga	1920
atggcatccg	catagtgcgc	tgggttatcg	ctcgccacgg	gaatatctgc	ggcagcgggc	1980
cagtaatggg	ttaagtgata	acaggtatct	ggaaatatag	gggcaaacc	acctggtcac	2040
tatctggaat	ttgacgaagt	gtgataactg	gtatagccag	attaatctaa	acctttgtct	2100
gacaaaatca	gataaagaag	agtagttcaa	aagacaactc	gtggactctc	attcagagag	2160
ataggcggtta	ccaaaatttg	tttggaactg	aacaagaaaa	ttgtatttgt	gtaactataa	2220
tcttaatgta	aaataaaaga	caccagttct	gtagaatatg	cttattgaag	agagtgtaat	2280
aataatttta	tatagatggt	gtacaaagaa	caggaatgag	taattattta	tgcttgatgt	2340
tttttgactc	ttgcttttta	tagttattat	ttttaagtta	gtcagcgcaa	taaaaacttg	2400
cttttaatat	taatgcgagt	tatgacatta	aacggaagaa	acataaaggc	atattttttgc	2460
cacaatatat	aatcatataa	tttaagttgt	agtgagttta	ttatgaatat	aaacaaacca	2520
ttagagattc	ttgggcacgt	atcctggcta	tgggccagtt	ctccactaca	cagaaactgg	2580
ccagtatctt	tgtttgcaat	aaatgtatta	cccgaatac	aggctaacca	atatgtttta	2640
ttaacccggg	atgattaccc	tgtcgcgtat	tgtagttggg	ctaatttaag	tttagaaaat	2700
gaaattaaat	atcttaatat	tgttacctca	ttagttgcag	aagactggac	ttcaggtgat	2760

cgtaaattggt	tcattgactg	gattgctcct	ttcggggata	acgggtgccct	gtacaaatat	2820
atgcgaaaaa	aattccctga	tgaactattc	agagccatca	gggtggatcc	caaaactcat	2880
gttggtaaaag	tatcagaatt	tcattggagg	aaaattgata	aacagttagc	gaataaaaatt	2940
tttaaacaat	atcaccacga	gttaataact	gaagtaaaaa	gaaagtcaga	ttttaattttt	3000
tcattaactg	gttaagaggt	aattaaatgc	caacaataac	cactgcacaa	attaaaagca	3060
cactgcagtc	tgcaaagcaa	tccgctgcaa	ataaattgca	ctcagcagga	caaagcacga	3120
aagatgcatt	agcctatgga	agtcagggtg	atcttaatcc	attaattaat	gaaatcagca	3180
aaatcatttc	agctgcaggt	agcttcgatg	ttaaagagga	aagaactgca	gcttctttat	3240
tgcagttgtc	cggtaatgcc	agtgattttt	catatggacg	gaactcaata	accctgacca	3300
catcagcata	atatattaat	ttaaattgata	gcaatcttac	tgggctgtgc	cacataagat	3360
tgctattttt	tttgaggtca	taatggattc	ttgtcataaa	attgattatg	ggttatacgc	3420
cctggagatt	ttagcccaat	accataacgt	ctctgttaac	cgggaagaaa	ttaaacaatag	3480
atgtgatata	gacgggacag	gtctgggatt	aacgtcatgg	ttgcttgctg	cgaaatcttt	3540
agaactaaag	gtaaaacagg	taaaaaaac	aattgatcga	ttaaacttta	tttttctgcc	3600
cgcattagtc	tggagagagg	atggacgtca	ttttattctg	actaaaatca	gcaaagaagt	3660
aaacagatat	cttatttttg	atgtggagca	gcgaaatccc	cgtgttctcg	aacagtctga	3720
gtttgaggcg	ttatatcagg	ggcatattat	tcttattact	tcccgttctt	ctgttaccgg	3780
gaaactggca	aaatttgact	ttacctgggt	tattcctgcc	attataaaat	acaggagaat	3840
atgttattga	acccttggtg	tatctgtttt	tttacaatta	tttgatttaa	taacccccct	3900
ttttttccag	gtgggttatg	acaaagtatt	agtgacacag	gggttttcaa	cccttaattgt	3960
tattactggt	gcattatctg	ttgtagtggg	gtttgagatt	atactcagcg	gtttaagaac	4020
ttacattttt	gcacatagta	caagtccgat	tgatgttgag	ttgggtgcca	aactcttccg	4080
gcattttact	gcgctaccga	tctcttattt	tgagagtcgt	cgtgttggtg	atactgttgc	4140
gagggttaaga	gaattagacc	agatccgtaa	ttttctgaca	ggacaggcat	taacatctgt	4200
tttggaactta	ttattttcac	tcataatttt	tgcggtaatg	tggattatac	gcccaaagct	4260
tactctgggt	atcttatttt	cgtgccttg	ttatgctgca	tggctctgtt	ttattagccc	4320
catttttgca	cgtcgccttg	atgataagtt	ttcacggaat	gcggataatc	aatctttcct	4380
ggtggaatca	gtaacggcga	ttaacactat	aaaagctatg	gcagtctcac	ctcagatgac	4440
gaacatatgg	gacaaacaat	tggcaggata	tgttgctgca	ggctttaaag	tgacagtatt	4500
agcaaccatt	ggtcaacaag	gaatacagtt	aatacaaaag	actgttatga	tcataaacct	4560
atgggttgga	gcacacctgg	ttattttccg	ggatttaagt	attggtcagt	taattgcttt	4620
taatattgct	gctggtcaga	ttgttgcaac	ggttatttcg	cttgacacaa	tctggcagga	4680
tttccagcag	gttgggtatat	cagttacccg	ccttggtgat	gtgcttaact	ctccaactga	4740
aagttatcat	gggaaactga	cattgccgga	aattaatggg	gatatacact	ttcgtaatat	4800
cgggtttcgc	tataaacctg	attctccggg	tattttggac	aatatcaatc	ttagtattaa	4860

gcagggggag gttattggta ttgtcggacg ttctgggtca ggaaaaagca cattaactaa 4920
attaattcaa cgtttttata ttcctgaaaa tggccaggta ttaattgatg gacatgatct 4980
tgcgttggtc gatcctaact gggttacgtc ttaggtgggg gttgtgttgc aggacaatgt 5040
gctgcttaat cgcagtatta ttgataatat ttcactggct aatcctggca tgtccgtcga 5100
aaaagttatt tatgcagcga aattagcagg cgctcatgat tttatttctg atttgctga 5160
ggggtataac accattgtcg ggggaacaggg ggcaggatta tccggaggtc aacgtcaacg 5220
catcgcaatt gcaagggcgc tgggtgaaca ccctaaaata ctcatTTTTg atgaagcaac 5280
cagtgtctcg gattatgagt cggagcatgt catcatgcgc aatatgcaca aaatatgtaa 5340
gggcagaacg gttataatca ttgtcatcg tctgtctaca gtaaaaaatg cagaccgcat 5400
tattgtcatg gaaaaagggg aaattgttga acagggtaaa cataaggagc tgctttctga 5460
accggaaaagt ttatacagtt acttatatca gttacagtca gactaacaga aagaacagaa 5520
gaatatgaaa acatgggttaa tgggggttcag cgagttcctg ttgcgtata aacttgtctg 5580
gagtgaaca tggaaaatcc ggaagcaatt agatactccg gtacgtgaaa aggacgaaaa 5640
tgaattctta cccgtcatc tggaattaat tgaaacgccg gtatccagac ggccgcgtct 5700
ggttgcttat tttattatgg ggtttctggg tattgctttt attttatctg ttttaggcca 5760
agtggaaaatt gttgccactg caaatgggaa attaacacac agtgggctga gtaaagaaat 5820
taaacctatt gaaaactcaa tagttaaaga aattatcgta aaagaaggag agtcagtcgg 5880
gaaaggggat gtgttattaa agcttacagc actgggagct gaagctgata cgttaaaaac 5940
acagtcatca ctgttacagg ccaggctgga acaactcgg tatcaaattc tgagcaggtc 6000
aattgaatta aataaactac ctgaactaaa gcttcctgat gagccttatt ttcagaatgt 6060
atctgaagag gaagtactgc gtttaacttc tttgataaaa gaacagtttt ccacatggca 6120
aaatcagaag tatcaaaaag aactgaattt ggataagaaa agagcagagc gattaacagt 6180
acttgcccgt ataaaccgtt atgaaaattt atcaagggtt gaaaaagcc gtctggatga 6240
tttcagtagt ttattgcata aacaggcaat tgcaaaacat gctgtacttg agcaggagaa 6300
taaataatgc gaagcagtaa atgaattacg agtttataaa tcacaactgg agcaaattga 6360
gagtgaagata ttgtctgcaa aagaagaata tcagcttggt acgcagcttt ttaaaaatga 6420
aatTTTTgat aagctaagac aaacaacaga caacattggg ttattaactc tggaattagc 6480
gaaaaatgaa gagcgtcaac aggtctcagt aatcagggcc ccagtttcgg gaaaagttca 6540
gcaactgaag gttcactctg aaggtggggg tggtacaaca gcggaaacac tgatgggtcat 6600
cgttccggaa gatgacacgc tggagggttac tgctctggta caaaataaag atattggttt 6660
tattaacgtc gggcagaatg ccatcattaa agtggaggca tttccttata cacgatatgg 6720
ttatctgggt ggtaagggtga aaaatataaa tttagatgca atagaagacc agagactggg 6780
acttgTTTTt aatgttatta tttctattga agagaattgt ttgtcaaccg ggaataaaaa 6840
cattccatta agctcgggta tggcagtcac tgcagaaata aagacaggta tgcgaagtgt 6900
aatcagttat cttcttagtc ctttagaaga gtcagtaaca gaaagtttac gtgagcgtta 6960

agtttcagaa	gtccagtatt	tgctgctata	cgtgctgcgt	ggcacttgcc	gtctgaacgg	7020
cattgatccg	gaagccaagt	caaacaacag	cgtgatgagc	gtcagggcaa	aacaccaagg	7080
ctctctcgat	gacaccagaa	caaattgaaa	tacgtgagct	gaggaaaaag	ctaccgagtt	7140
cttgatgttg	gactccctga	acagttctct	gtaatcggga	aactcaggac	gcgttatcct	7200
gtggtcacac	tctgccatgt	gtttaggggt	catcacagca	gctacagata	ctggtaaaac	7260
cgtcctgaaa	aaccagacgg	cagacgggct	gtattacgta	gtcaggtact	tgagctacat	7320
ggcatcagtc	acggtttggt	cggagcaaga	cgtatcacca	caatggcaac	ccggagaggt	7380
gtcagcgcca	gtgatataag	acggttaacg	gttaaaaatc	gtggcggtga	caacatccca	7440
gtggactgag	gtcacacagg	cctggcagca	ttcctcttcc	ggccggatga	cccggatttc	7500
acggggaaaag	tacgccgata	acagtttacg	ggctgaagat	tggcgtaggg	aggatagcag	7560
acgttttgcc	gccccattg	tctggagttg	ggtgagaagg	catcatttca	ccaacaccaa	7620
catttcacag	ttacacccca	cagctacatg	aagcgcttcc	atgaattatc	gctttgatth	7680
atcatgttaa	aatagctcta	cacggttggg	tcaggattgc	gcaccgaaac	cctctaaaat	7740
ccactgacgc	gcctgcgaat	tatccagcac	cgcgccttcc	gagatcctct	acgccggacg	7800
catcgtggcc	ggcatcaccg	gcgccacagg	tgcggttgct	ggcgccata	tcgccgacat	7860
caccgatggg	gaagatcggg	ctcgccactt	cgggctcatg	agcgcttggt	tcggcgtagg	7920
tatgggtggca	ggccccgtgg	ccgggggact	gttgggcgcc	atctccttgc	atgcaccatt	7980
ccttgccggcg	gcgggtgctca	acggcctcaa	cctactactg	ggctgcttcc	taatgcagga	8040
gtcgcataag	ggagagcgtc	gaaccgatgc	cttgagagcc	ttcaaccag	tcagctcctt	8100
ccgggtgggcg	cggggcatga	ctatcgtcgc	cgcacttatg	actgtcttct	ttatcatgca	8160
actcgtagga	caggtgccgg	cagcgctctg	ggtcattttc	ggcgaggacc	gctttcgctg	8220
gagcgcgacg	atgateggcc	tgtegttgc	ggtattcgga	atcttgacag	ccctcgctca	8280
agccttcgtc	actgggtccc	ccaccaaacg	tttcggcgag	aagcaggcca	ttatcgccgg	8340
catggcgggc	gacgcgctgg	gctacgtctt	gctggcggtc	gcgacgcgag	gctggatggc	8400
cttccccatt	atgattcttc	tcgcttccgg	cggcatcggg	atgcccgct	tgaggccat	8460
gctgtccagg	caggtagatg	acgaccatca	gggacagctt	caaggatcgc	tcgcggctct	8520
taccagccta	acttcgatca	ttggaccgct	gacgtcacg	gcgatttatg	ccgcctcggc	8580
gagcacatgg	aacgggttgg	catggattgt	aggcgccgcc	ctataccttg	tctgcctccc	8640
cgcgttgctg	cgcgggtgat	ggagccgggc	cacctcgacc	tgaatggaag	ccggcggcac	8700
ctcgctaacy	gattcaccac	tccaagaatt	ggagccaatc	aattcttgcg	gagaactgtg	8760
aatgcgcaaa	ccaacccttg	gcagaacata	tccatcgctg	ccgccatctc	cagcagccgc	8820
acgcggcgca	tctcgggcag	cgttggggtc	tggccacggg	tgcgcatgat	cgtgctcctg	8880
tcgttgagga	cccggctagg	ctggcggggt	tgccctactg	gttagcagaa	tgaatcaccg	8940
atacgcgagc	gaacgtgaag	cgactgctgc	tgcaaaacgt	ctgcgacctg	agcaacaaca	9000
tgaatgggtct	tcgggtttccg	tgtttcgtaa	agtctggaaa	cgcggaagtc	agcgccctgc	9060

accattatgt	tccgatctg	catcgcagga	tgctgctggc	taccctgtgg	aacacctaca	9120
tctgtattaa	cgaagcgctg	gcattgaccc	tgagtgattt	ttctctggtc	ccgccgcac	9180
cataccgcc	gttggtttacc	ctcacaacgt	tccagtaacc	gggcatgttc	atcatcagta	9240
acccgtatcg	tgagcatcct	ctctcgtttc	atcggtatca	ttacccccat	gaacagaaat	9300
cccccttaca	cggaggcatc	agtgaccaa	caggaaaaa	ccgcccttaa	catggcccg	9360
tttatcagaa	gccagacatt	aacgcttctg	gagaaactca	acgagctgga	cgcggatgaa	9420
caggcagaca	tctgtgaatc	gcttcacgac	cacgctgatg	agctttaccg	cagctgcctc	9480
gcgcgtttcg	gtgatgacgg	tgaaaacctc	tgacacatgc	agctcccgga	gacggtcaca	9540
gcttgtctgt	aagcggatgc	cgggagcaga	caagcccgtc	agggcgcgtc	agcgggtggt	9600
ggcgggtgtc	ggggcgcgac	catgacccag	tcacgtagcg	atagcggagt	gtatactggc	9660
ttaactatgc	ggcatcagag	cagattgtac	tgagagtgca	ccatatgcgg	tgtgaaatac	9720
cgcacagatg	cgtaaggaga	aaataccgca	tcaggcgctc	ttccgcttcc	tcgctcactg	9780
actcgctgcg	ctcggtcggt	cggctgcggc	gagcgggtatc	agctcactca	aaggcggtaa	9840
tacggttatc	cacagaatca	ggggataacg	caggaaagaa	catgtgagca	aaaggccagc	9900
aaaaggccag	gaaccgtaaa	aaggccgcgt	tgctggcggt	tttccatagg	ctccgcccc	9960
ctgacgagca	tcacaaaaat	cgacgctcaa	gtcagagggtg	gcgaaacccg	acaggactat	10020
aaagatacca	ggcggtttccc	cctggaagct	ccctcggtcg	ctctcctggt	ccgacctg	10080
cgccttaccgg	atacctgtcc	gcctttctcc	cttcgggaag	cgtggcgctt	tctcatagct	10140
cacgctgtag	gtatctcagt	tcggtgtagg	tcgttcgctc	caagctgggc	tgtgtgcacg	10200
aaccccccg	tcagcccgac	cgtgcgcct	tatccggtaa	ctatcgtctt	gagccaacc	10260
cggtaagaca	cgacttatcg	ccactggcag	cagccactgg	taacaggatt	agcagagcga	10320
ggtagtagg	cgggtgctaca	gagttcttga	agtgggtggc	taactacggc	tactactagaa	10380
ggacagtatt	tggtatctgc	gctctgctga	agccagttac	cttcggaaaa	agagttggta	10440
gctcttgatc	cggcaaacaa	accacgcgtg	gtagcgggtg	tttttttgtt	tgcaagcagc	10500
agattacg	cagaaaaaaa	ggatctcaag	aagatccttt	gatcttttct	acggggtctg	10560
acgctcagt	gaacgaaaac	tcacgttaag	ggattttggt	catgagatta	tcaaaaagga	10620
tcttcaccta	gatcctttta	aattaaaaat	gaagttttta	atcaatctaa	agtatatatg	10680
agtaaacttg	gtctgacagt	taccaatgct	taatcagtga	ggcacctatc	tcagcgatct	10740
gtctatttcg	ttcatccata	gttgctgac	tccccatatg	aatatcctcc	ttagttccta	10800
ttccgaagtt	cctattctct	agaaagtata	ggaacttcag	agcgcttttg	aagctggggt	10860
gggcgaagaa	ctccagcatg	agatccccgc	gctggaggat	catccagccg	gcgtcccgga	10920
aaacgattcc	gaagcccaac	ctttcataga	aggcggcggt	ggaatcgaaa	tctcgtgatg	10980
gcagggtggg	cgctcgcttg	tcggtcattt	cgaaccccag	agtcccgcctc	agaagaactc	11040
gtcaagaagg	cgatagaagg	cgatgcgctg	cgaatcggga	gcggcgatac	cgtaaagcac	11100
gaggaagcgg	tcagcccatt	cgccgccaa	ctcttcagca	atatcacggg	tagccaacgc	11160

tatgtcctga tagcggtccg ccacaccag ccggccacag tcgatgaatc cagaaaagcg 11220
 gccattttcc accatgatat tcggcaagca ggcacgcga tgggtcacga cgagatcctc 11280
 gccgtcgggc atgcgcgcct tgagcctggc gaacagttcg gctggcgca gccctgatg 11340
 ctcttcgtcc agatcatcct gatcgacaag accggcttcc atccgagtac gtgctcgctc 11400
 gatgcgatgt ttcgcttggg ggtcgaatgg gcaggtagcc ggatcaagcg tatgcagccg 11460
 ccgcattgca tcagccatga tggatacttt ctcggcagga gcaaggtgag atgacaggag 11520
 atcctgcccc ggcaacttcgc ccaatagcag ccagtcctt cccgcttcag tgacaacgtc 11580
 gagcacagct gcgcaaggaa cggccgtcgt ggccagccac gatagccgcg ctgcctcgtc 11640
 ctgcagttca ttcagggcac cggacaggtc ggtcttgaca aaaagaaccg ggcgccctg 11700
 cgctgacagc cggaacacgg cggcacaga gcagccgatt gtctgttggt cccagtcata 11760
 gccgaatagc ctctccacc aagcggccgg agaactgcg tgcaatccat cttgttcaat 11820
 catgcgaaac gatcctcatc ctgtctcttg atcagatctt gatccctgc gccatcagat 11880
 ccttggcggc aagaaagcca tccagtttac tttgcagggc tcccaacct taccagaggg 11940
 cgccccagct ggcaattccg gttcgttgc tgtccataaa accgcccagt ctagctatcg 12000
 ccatgtaagc ccactgcaag ctacctgctt tctctttgcg cttgcgtttt cccttgtcca 12060
 gatagcccag tagctgacat tcatccgggg tcagcaccgt ttctgcggac tggctttcta 12120
 cgtgttccgc ttcttttagc agcccttgcg ccctgagtgc ttgcggcagc gtgggggatc 12180
 ttgaagttcc tattccgaag ttcctattct ctagaaagta taggaacttc gaagcagctc 12240
 cagcctacac caaaaaagg aataagggcg acacggaaat gttgaatact catactcttc 12300
 ctttttcaat attattgaag catttatcag ggttattgtc tcatgagcgg atacatattt 12360
 gaatgtattt agaaaaataa acaaataagg gttccgcgca catttccccg aaaagtgcc 12420
 cctgacgtct aagaaacct tattatcatg acattaacct ataaaaatag gcgtatcacg 12480
 aggccctttc gtcttcaaga attctcatgt ttgacagctt atcatcgatg gacattattt 12540
 ttgtggagcc ggaggaaaca gaccagcgg ttcagatgag gcgcttacca ccagaaccgc 12600
 tgttgtccca ccattctggc gattcccaa cgctatttgg ataaaaagta gccttaacgt 12660
 ggtttatatt cc 12672

hlyA:

ATGCCAACAATAACCACTGCACAAATTAAAAGCACACTGCAGTCTGCAAAGCAATCCGCT
 GCAAATAAATTGCACTCAGCAGGACAAAGCACGAAAGATGCATTAGCCTATGGAAGTCAG
 GGTGATCTTAATCCATTAAATTAATGAAATCAGCAAAATCATTTACAGTGCAGGTAGCTTC
 GATGTTAAAGAGGAAAGAACTGCAGCTTCTTTATTCAGTTGTCCGGTAATGCCAGTGAT
 TTTTCATATGGACGGAACCTCAATAACCCTGACCACATCAGCATAA

Фиг. 1

hlyB:

ATGGATTCTTGTCAATAAATTGATTATGGGTATACGCCCTGGAGATTTTAGCCCAATAC
 CATAACGTCTCTGTAAACCCGGAAGAAATTAAACATAGATTTGATACAGACGGGACAGGT
 CTGGGATTAACGTATGTTGCTTGGCTGCGAAATCTTTAGAACTAAAGGTAAAACAGGTA
 AAAAAACAATTGATCGATTAACTTTATTTTCTGCCCGCAATTAGTCTGGAGAGAGGAT
 GGACGTCATTTTATTCTGACTAAAATCAGCAAGAAGTAAACAGATATCTTATTTTTGAT
 TTGGAGCAGCGAAATCCCCGTGTTCTCGAACAGTCTGAGTTTGAGGCGTTATATCAGGGG
 CATATTATTCTTATTACTTCCCGTTCTTCTGTTACCGGAAACTGGCAAAATTTGACTTT
 ACCTGGTTTTATTCTGCCATTATAAAATACAGGAGAATATTTATTGAAACCCCTTGTTGTA
 TCTGTTTTTTTACAATTATTTGCATTATAAACCCCCCTTTTTTTTTCAGGTGGTTATGGAC
 AAAGTATTAGTGACAGGGGGTTTTCAACCCCTTAATGTTATTACTGTTGCCTTATCTGTT
 GTAGTGGTGTTTGAGATTATACTCAGCGGTTTAAAGAACTACATTTTTGCACATAGTACA
 AGTCGGATTGATGTTGAGTTGGGTGCCAACTCTTCCGGCATTTACTGGCGCTACCGATC
 TCTTATTTTGAGAGTCGTGTTGGTGATACTGTTGCGAGGGTAAGAGAATTAGACCAG
 ATCCGTAATTTTCTGACAGGACAGGCATTAACATCTGTTTTGGACTTATTATTTTCACTC
 ATATTTTTTTCGGTAATGTGGTATTACAGCCCAAAGCTTACTCTGGTGATCTTATTTTCG
 CTGCCTTGTTATGCTGCATGGTCTGTTTTTATTAGCCCCATTTTGGCAGCTCGCCTTGAT
 GATAAGTTTTTACGGAATGCGGATAATCAATCTTCTGTTGGAATCAGTAACGGCGATT
 AACACTATAAAGCTATGGCAGTCTCACCTCAGATGACGAACATATGGGACAAACAATTG
 GCAGGATATGTTGCTGCAAGGCTTAAAGTGACAGTATTAGCAACCATTGGTCAACAAGGA
 ATACAGTTAATACAAAAGACTGTTATGATCATCAACCTATGGTTGGGAGCACACCTGGTT
 ATTTCCGGGGATTAAAGTATTGGTCAGTTAATTGCTTTTAAATATGCTTGCTGGTCAGATT
 GTTGCACCGGTTATTTCGCTTGACAAATCTGGCAGGATTTCCAGCAGGTTGGTATATCA
 GTTACCCGCCCTGGTGATGTGCTTAACCTCTCAACTGAAAGTTATCATGGGAAACTGACA
 TTGCCGGAATAATGGTGATATCACTTTTCGTAATATCCGGTTTCGCTATAAACCTGAT
 TCTCCGGTTATTTTGACAATATCAATCTTAGTATTAAGCAGGGGGAGGTTATTGGTATT
 GTCGGACGTTCTGGTTCAGGAAAAAGCACATTAACTAAATTAATTCAACGTTTTTATATT
 CCTGAAAAATGGCCAGGTATTAATTGATGGACATGATCTTGCGTTGGCCGATCCTAACTGG
 TTACGTCGTCAGGTGGGGGTTGTGTTGCAGGACAAATGTGCTGCTTAATCGCAGTATTATT
 GATAATATTTCACTGGCTAATCCTGGCATGTCCGTCGAAAAAGTTATTTATGCAGCGAAA
 TTAGCAGGTGCTCATGATTTTATTTCTGAATTGCGTGAGGGGTATAACACCATTGTCCGG
 GAACAGGGGGCAGGATTATCCGGAGGTCAACGTCAACGCATCGCAATTGCAAGGGCGCTG
 GTGAACAACCCTAAAATACTCATTTTTGATGAAGCAACCAAGTCTCTGGATTATGAGTCG
 GAGCATGTCAATCATGCGCAATATGCACAAAATATGTAAGGGCAGAACGGTTATAATCAAT
 GCTCATCTGTCTGTCTACAGTAAAAAATGCAGACCGCATTTATTGTCTATGAAAAAGGGAAA
 ATTTGTTGAACAGGGTAAACATAAGGAGCTGCTTTCTGAACCGGAAAGTTTATACAGTTAC
 TTATATCAGTTACAGTCAGACTAA

Фиг. 2

hlyD:

ATGAAAACATGGTTAATGGGGTTCAGCGAGTTCCTGTTGCGCTATAAACTTGTCTGGAGT
 GAAACATGGAAAATCCGGAAGCAATTAGATACTCCGGTACGTGAAAAGGACGAAAATGAA
 TTCTTACCCGCTCATCTGGAATTAATTGAAACGCCAGTATCCAGACGGCCGCGTCTGGTT
 GCTTATTTTATTATGGGGTTTCTGGTTATTGCTTTTATTTTATCTGTTTTAGGCCAAGTG
 GAAATTGTTGCCACTGCAAAATGGGAAATTAACACACAGTGGGCGTAGTAAAGAAATTA
 CCTATTGAAAACCTCAATAGTTAAAGAAATTATCGTAAAAAGAGGAGAGTCAGTCCGGA
 GGGGATGTGTTATTAAAGCTTACAGCACTGGGAGCTGAAGCTGATACGTTAAAAACACAG
 TCATCACTGTTACAGGCCAGGCTGGAACAACTCGGTATCAAATTCTGAGCAGGTCAATT
 GAATTAAATAAACTACCTGAACATAAGCTTCCTGATGAGCCTTATTTTCAGAATGTATCT
 GAAGAGGAAGTACTGCGTTTAACTTCTTTGATAAAAAGAACAGTTTTCCACATGGCAAAAT
 CAGAAGTATCAAAAAGAACTGAATTTGGATAAGAAAAGAGCAGAGCGATTAACAGTACTT
 GCCCGTATAAACCGTTATGAAAATTTATCAAGGGTTGAAAAAGCCGCTCTGGATGATTTC
 AGTAGTTTATTGCATAAACAGGCAATTGCAAAACATGCTGTACTTGAGCAGGAGAATAAA
 TATGTCGAAGCAGTAAATGAATTACGAGTTTATAAATCACAACTGGAGCAAATTGAGAGT
 GAGATATTGTCTGCAAAAAGAAGATATCAGCTTGTTACGCAGCTTTTTTAAAAATGAAATT
 TTAGATAAGCTAAGACAAACCACAGACAACATTGGGTTATTAACCTCTGGAATTAGCGAAA
 AATGAAGAGCGTCAACAGGCTTCAGTAATCAGGGCCCCAGTTTCGGTAAAAGTTTCAGCAA
 CTGAAGGTTTCACTGAAGGTGGGGTTGTTACAACAGCGGAAACACTGATGGTCATCGTT
 CCGGAAGATGACACGCTGGAGGTTACTGCTCTGGTACAAAATAAGATATTGGTTTTATT
 AACGTGGGGCAGAATGCCATCATTAAAGTGGAGGCATTTCTTATACACGATATGGTTAT
 CTGGTGGGTAAGGTGAAAAATATAAATTTAGATGCAATAGAAGACCAGAGACTGGGACTT
 GTTTTTAATGTTATTATTTCTATTGAAGAGAATTGTTTGTCAACCGGAAATAAAAACATT
 CCATTAAGCTCGGGTATGGCAGTCACTGCAGAAATAAGACAGGTATGCGAAGTGTAATC
 AGTTATCTTCTTAGTCCTTTAGAAGAGTCAGTAACAGAAAGTTTACGTGAGCGTTAA

Фиг. 3

PSA:

GTGGGAGGCTGGGAGTGCAGAGAAGCATTCCCAACCCCTGGCAGGTGCTTGTTGGCCTCTCGT
 GGCAGGGCAGTCTGCGGCGGTGTTCTGGTGCACCCCCAGTGGGTCCCTCACAGCTGCCCAC
 TGCATCAGGAACAAAAGCGTGATCTTGCTGGGTGGGCACAGCCTGTTTCATCCTGAAGAC
 ACAGGCCAGGTATTTAGGTACGCCACAGCTTCCCACACCCGCTCTACGATATGAGCCTC
 CTGAAGAATCGATTCCCTCAGGCCAGGTGATGACTCCAGCCACGACCTCATGCTGCTCCGC
 CTGTCAGAGCCTGCCGAGCTCACGGAIGCTGTGAAGGTGATGGACCTGCCCACCCAGGAG
 CCAGCACTGGGGACCACCTGCTACGCCTCAGGCTGGGGCAGCATTGAACCAGAGGAGTTC
 TTGACCCCAAAGAACTTCAGTGTGTGGACCTCCATGTTATTTCCAATGACGTGTGTGCG
 CAAGTTCACCCCTCAGAAGGTGACCAAGTTCATGCTGTGTGCTGGACGCTGGACAGGGGGC
 AAAAGCACCTGCTCGGGTGATTCTGGGGGCCCACTTGCTGTGAATGGTGTGCTTCAAGGT
 ATCACGTCATGGGGCAGTGAACCATGTGCCCTGCCCCGAAAGGCCTTCCCTGTACACCAAG
 GTGGTGCATTACCGGAAGTGGATCAAGGACACCATCGTGGCCAACCC

Фиг. 4**CtxB:**

CCTCAAATATTACTGATTTGTGTGCAGAATACCACAACACACAAATATATACGCTAAAT
 GATAAGATATTTTCGTATACAGAATCTCTAGCTGGAAAAAGAGAGATGGCTATCATTA
 TTTAAGAATGGTGCAATTTTCAAGTAGAAGTACCAGGTAGTCAACATATAGATTCACAA
 AAAAAAGCGATTGAAAGGATGAAGGATACCCCTGAGGATTGCATATCTTACTGAAGCTAAA
 GTCGAAAAGTTATGTGTATGGAATAATAAACGCCTCATGCGATTGCCGCA

Фиг. 5

B-Raf KD:

GATGATTGGGAGATTCCCTGATGGGCAGATTACAGTGGGACAAAGAAAGGGAAAGTGGCAT
 GGTGATGTGGCAGTGAAAATGTTGAATGTGACAGCACCTACACCTCAGCAGTTACAAGCC
 TTCAAAAATGAAGTAGGAGTACTCAGGAAAACACGACATGTGAATATCCTACTCTTCATG
 GGCTATTCCACAAAGCCACAACCTGGCTATTGTTACCCAGTGGTGTGAGGGCTCCAGCTTG
 TATCACCATCTCCATATCATTGAGACCAAATTTGAGATGATCAAACCTTATAGATATTGCA
 CGACAGACTGCACAGGGCATGGATTACTTACACGCCAAGTCAATCATCCACAGAGACCTC
 AAGAGTAATAATATATTTCTTCATGAAGACCTCACAGTAAAAATAGGTGATTTTGGTCTA
 GCTACAGAGAAATCTCGATGGAGTGGGTCCCATCAGTTTGAACAGTTGTCTGGATCCATT
 TTGTGGATGGCACCAGAAGTCATCAGAATGCAAGATAAAAATCCATACAGCTTTCAGTCA
 GATGTATATGCATTTGGGATTGTTCTGTATGAATTGATGACTGGACAGTTACCTTATTCA
 AACATCAACAACAGGGACCAGATAATTTTTATGGTGGGACGAGGATACCTGTCTCCAGAT
 CTCAGTAAGGTACGGAGTAACTGTCCAAAAGCCATGAAGAGATTAATGGCAGAGTGCCTC
 AAAAAGAAAAGAGATGAGAGACCACTCTTTCCCAAATTCCTCGCCTCTATTGAGCTGCTG
 GCCCGCTCATTGCCAAAAATTCACCGCAGTGCATCAGAACCCTCCTTGAATCGGGCTGGT
 TTCCAAACAGAGGATTTTAGTCTATATGCTTGTGCTTCTCCAAAACACCCATCCAGGCA
 GGGGGATATGGTGCCTTTCCTGTCCAC

Фиг. 6**B-Raf V600E:**

CGATTTTGGCCTGGCGACCGAAAAAGCGGGCGATTTTGGCCTGGCGACCGAAAAAGCGGGC
 GATTTTGGCCTGGCGACCGAAAAAGCGGGC

Фиг. 7

Ctx - PSA - HlyA:

ATGCCAACAATAACCACTGCACAAATTAAAAGCACACTGCAGTCTGCAAAGCAATCCGCT
GCAAATAAATTGCACTCAGCAGGACAAAGCACGAAAGATGCATCACCTCAAAATATTACT
GATTGTGTGTCAGAATACCACAACACACAAATATATACGCTAAATGATAAGATATTTTCG
TATACAGAATCTCTAGCTGGAAAAAGAGAGATGGCTATCATTACTTTTAAGAATGGTGCA
ATTTTTCAAGTAGAAGTACCAGGTAGTCAACATATAGATTACAAAAAAAAGCGATTGAA
AGGATGAAGGATACCCTGAGGATTGCATATCTTACTGAAGCTAAAGTCGAAAAGTTATGT
GTAIGGAATAATAAAACGCCTCATGCGATTGCCGCAATGCCCGTGGGAGGCTGGGAGTG
GAGAAGCATTCCTCAACCTGGCAGGTGCTTGTGGCTCTCGTGGCAGGGCAGTCTGCGGC
GGTGTCTGGTGCACCCCCAGTGGGTCTCACAGCTGCCCACTGCATCAGGAACAAAAGC
GTGATCTTGTGGGTGCGCACAGCCTGTTTCATCCTGAAGACACAGGCCAGGTATTTTCAG
GTCAGCCACAGCTTCCCACACCCGCTCTACGATATGAGCCTCCTGAAGAATCGATTCTC
AGGCCAGGTGATGACTCCAGCCACGACCTCATGCTGCTCCGCTGTICAGAGCCTGCCGAG
CTCACGGATGCTGTGAAGGTATGGACCTGCCACCCAGGAGCCAGCACTGGGGACCACC
TGCTACGCCTCAGGCTGGGGCAGCATTGAACCAGAGGAGTTCTTGACCCCAAAGAACTT
CAGTGTGTGGACCTCCATGTTATTTCCAATGACGIGTGTGCGCAAGTTCACCCTCAGAAG
GTGACCAAGTTCATGCTGTGTGCTGGACGCTGGACAGGGGGCAAAGCACCTGCTCGGGT
GATTCTGGGGGCCCACTTGTCTGTAATGGTGTGCTTCAAGGTATCACGTCATGGGGCAGT
GAACCATGTGCCCTGCCCGAAAGGCCTTCCCTGTACACCAAGGTGGTGCATTACCGGAAG
TGGATCAAGGACACCATCGTGGCCAACCCCGGGCATGCATTAGCCTATGGAAGTCAGGGT
GATCTTAATCCATTAATTAATGAAATCAGCAAAATCATTTCAGCTGCAGGTAGCTTCGAT
GTTAAAGAGGAAAGAACTGCAGCTTCTTTATTGCAGTTGTCCGGTAATGCCAGTGATTTT
TCATATGGACGGAACCTCAATAACCCTGACCACATCAGCATAA

Фиг. 8

Ctx - эпитоп B-raf V600E - HlyA

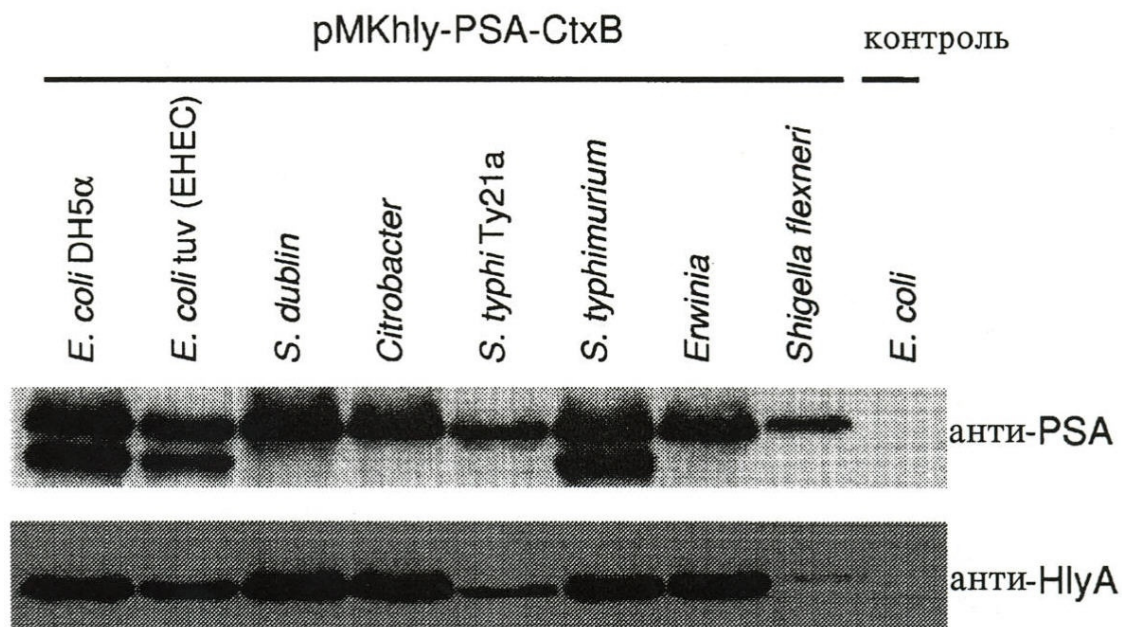
ATGACAACAATAACCACTGCACAAATTAAAAGCACACTGCAGTCTGCAAAGCAATCCGCT
GCAAATAAATTGCACTCAGCAGGACAAAGCACGAAAGATGCATCACCTCAAAATATTACT
GATTGTGTGCAGAATACCACAACACACAAATACATACGCTAAATGATAAGATATTTTCG
TATACAGAATCTCTAGCTGGAAAAAGAGAGATGGCTATCATTACTTTTAAGAATGGTGCA
ACTTTTCAAGTAGAAGTACCAGGTAGTCAACATATAGATTACAAAAAAGCGATTGAA
AGGATGAAGGATACCTGAGGATTGCATATCTTACTGAAGCTAAAGTCGAAAAGTTATGT
GTATGGAATAATAAAACGCCTCATGCGATTGCCGCAATGCCCGGCGATTTTGGCCTGGCG
ACCGAAAAAGCGGGCGATTTTGGCCTGGCGACCGAAAAAGCGGGCGATTTTGGCCTGGCG
ACCGAAAAAGCGGGGCATGCATTAGCCTATGGAAGTCAGGGTGATCTTAATCCATTAATT
AATGAAATCAGCAAAATCATTTTCAGCTGCAGGTAGCTTCGATGTTAAAGAGGAAAGAACT
GCAGCTTCTTTATTGCAGTTGTCCGGTAATGCCAGTGATTTTTCATATGGACGGAACCTCA
ATAACCCTGACCACATCAGCATAA

Фиг. 9

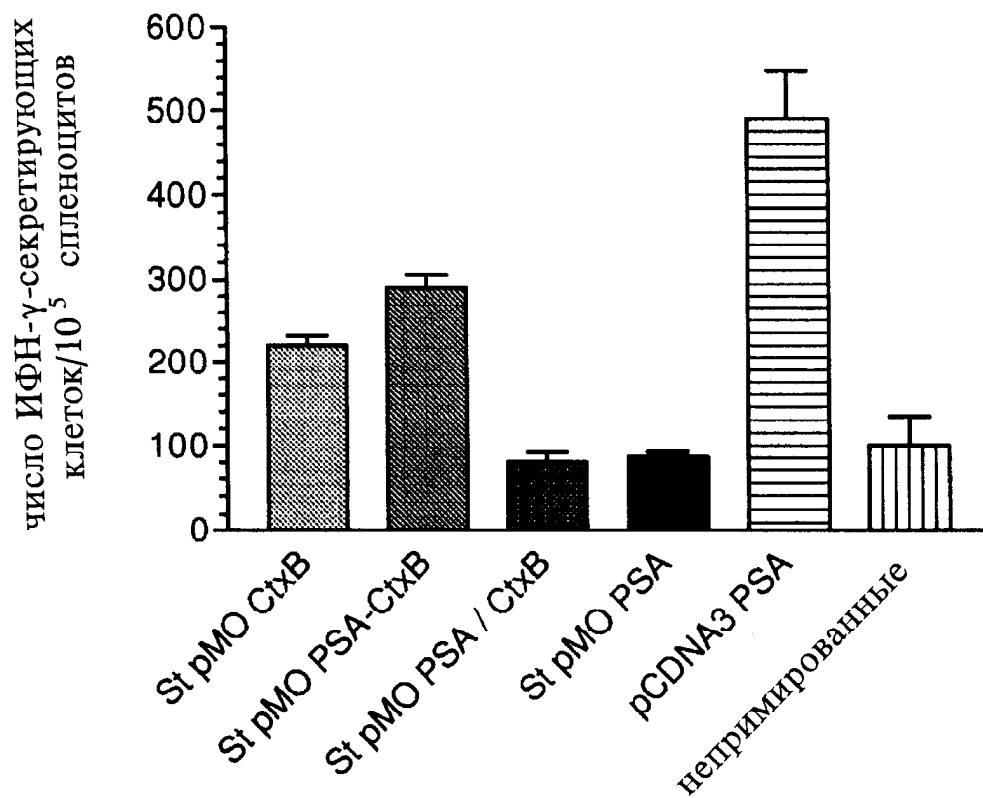
Ctx - BRAF KD - HlyA:

ATGCCAACAATAACCACTGCACAAATTAAAAGCACACTGCAGTCTGCAAAGCAATCCGCT
 GCAAATAAATTGCCTCAGCAGGACAAAGCACGAAAGATGCATCACCTCAAAATATTACT
 GATTGTGTGTCAGAATACCACAACACACAAATATATACGCTAAATGATAAGATATTTTCG
 TATACAGAATCTCTAGCTGGAAAAAGAGAGATGGCTATCATTACTTTTAAGAATGGTGCA
 ATTTTTCAAGTAGAAGTACCAGGTAGTCAACATATAGATTACAAAAAAAGCGATTGAA
 AGGATGAAGGATACCTGAGGATTGCATATCTTACTGAAGCTAAAGTCGAAAAGTTATGT
 GTATGGAATAATAAACGCCTCATGCGATTGCCGCAATGCCCGATGATTGGGAGATTCCCT
 GATGGGCAGATTACAGTGGGACAAAGAAAGGGAAAGTGGCATGGTGTATGTGGCAGTGAAA
 ATGTTGAATGTGACAGCACCTACACCTCAGCAGTTACAAGCCTTCAAAAATGAAGTAGGA
 GTACTCAGGAAAACACGACATGTGAATATCCTACTCTTCATGGGCTATTCCACAAAGCCA
 CAACTGGCTATTGTTACCCAGTGGTGTGAGGGCTCCAGCTTGTATCACCATCTCCATATC
 ATTGAGACCAAATTTGAGATGATCAAACCTTATAGATATTGCACGACAGACTGCACAGGGC
 ATGGATTACTTACACGCCAAGTCAATCATCCACAGAGACCTCAAGAGTAATAATATATTT
 CTTTCATGAAGACCTCACAGTAAAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACAGAGAAATCTCGA
 TGGAGTGGGTCCCATCAGTTTGAACAGTTGTCTGGATCCATTTTGTGGATGGCACCAGAA
 GTCATCAGAATGCAAGATAAAAAATCCATACAGCTTTCAGTCAGATGTATATGCATTTGGG
 ATTGTTCTGTATGAATTGATGACTGGACAGTTACCTTATTCAAACATCAACAACAGGGAC
 CAGATAATTTTTATGGTGGGACGAGGATACCTGTCTCCAGATCTCAGTAAGGTACGGAGT
 AACTGTCCAAAAGCCATGAAGAGATTAATGGCAGAGTGCCTCAAAAAGAAAAGAGATGAG
 AGACCACTCTTTCCCCAAATTCTCGCCTCTATTGAGCTGCTGGCCCGCTCATTGCCAAAA
 ATTCACCGCAGTGCATCAGAACCCTCCTTGAATCGGGCTGGTTTCCAAACAGAGGATTTT
 AGTCTATATGCTTGTGCTTCTCCAAAAACACCCATCCAGGCAGGGGGATATGGTGCGTTT
 CCTGTCCACGGGCATGCATTAGCCTATGGAAGTCAGGGTGATCTTAATCCATTAATTAAT
 GAAATCAGCAAAATCATTTCAGCTGCAGGTAGCTTCGATGTTAAAGAGGAAAGAACTGCA
 GCTTCTTTATTGCAGTTGTCCGGTAATGCCAGTGATTTTTTCATATGGACGGAACCTCAATA
 ACCCTGACCACATCAGCATAA

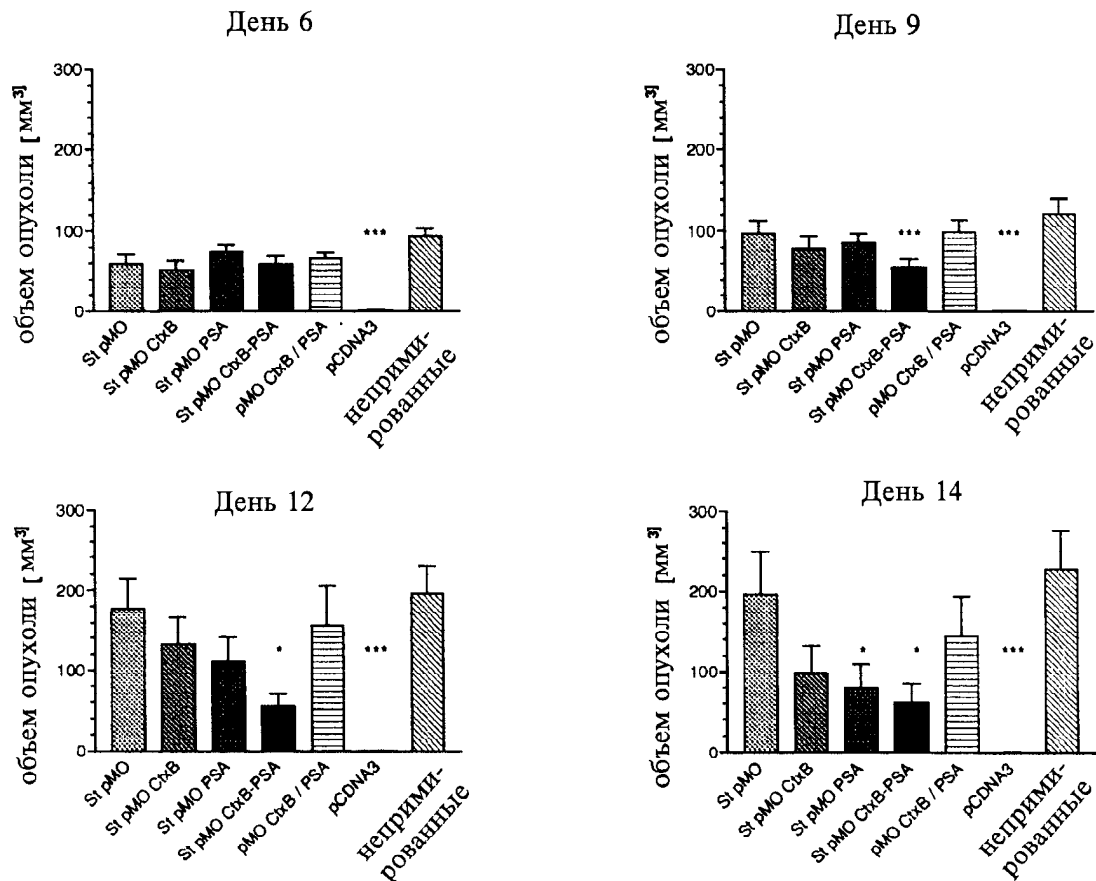
Фиг. 10



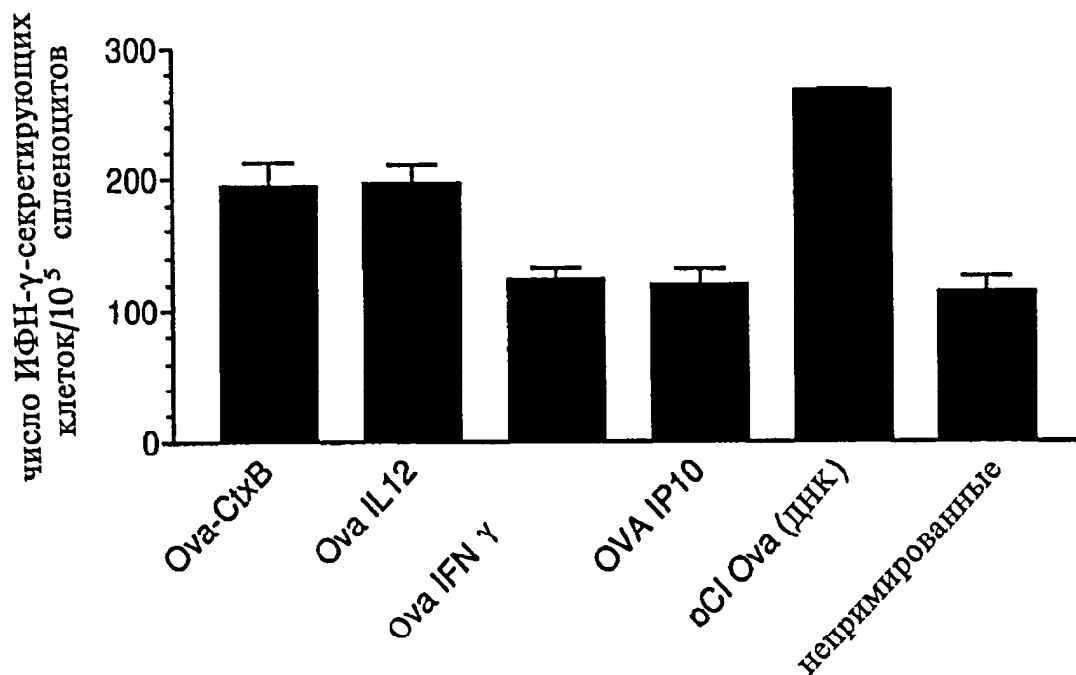
Фиг. 11



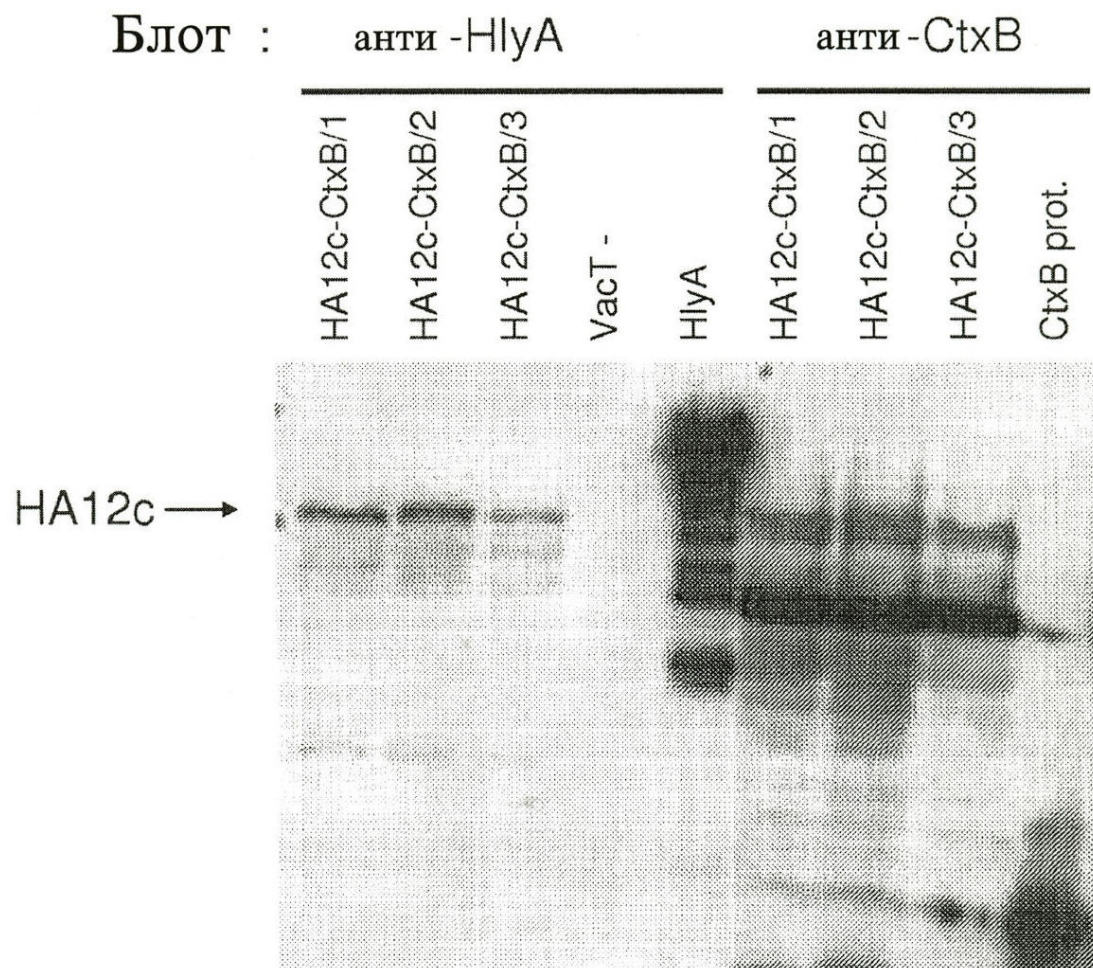
Фиг. 12



Фиг. 13



Фиг. 14

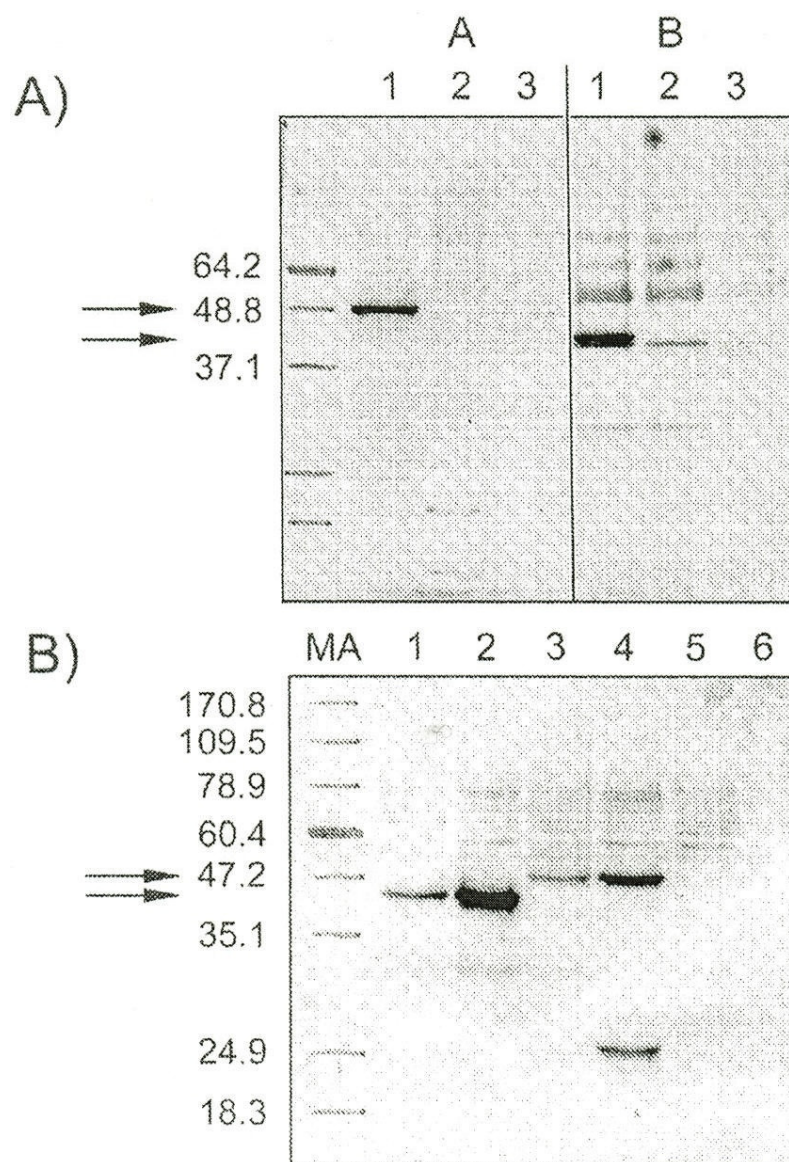


Фиг. 15

CtxB-HA12c-HlyA:

ATGACAACAATAACCACTGCACAAATTAAGCAGACTGCAGTCTGCAAAGCAATCCGCT
 GCAAATAAATTGCACTCAGCAGGACAAAGCAGGAAAGATGCATCACCTCAAATATTACT
 GATTTGTGTGCAGAATACCACAACACACAAATACATACGCTAAATGATAAGATATTTTCG
 TATACAGAACTCTAGCTGGAAAAGAGAGATGGCTATCATTACTTTTAAGAATGGTGCA
 ACTTTTCAAGTAGAAGTACCAGGTAGTCAACATATAGATTACAAAAAAGCGATTGAA
 AGGATGAAGGATACCCTGAGGATTGCATATCTTACTGAAGCTAAAGTCGAAAAGTTATGT
 GTATGGAATAATAAACGCCCTCATGCGATTGCCGCAATGCCCATCTGTCAAATGGAGAAA
 ATAGTGCTTCTTTTGAATAGTCAGTCTTGTAAAAAGTGATCAGATTTCATTGGTTAC
 CATGCAAACAACCTCGACAGAGCAGGTTGACACAATAATGGAAGAAGCGTTACTGTTACA
 CATGCCCAAGACATACTGGAAGACACACAACGGGAAGCTCTGCGATCTAGATGGAGTG
 AAGCCTCTAATTTTGGAGAGATTGTAGTGTAGCTGGATGGCTCCTCGGAAACCAATGTGT
 GACGAATTCATCAATGTGCCGAATGGTCTACATAGTGGAGAAGGCCAATCCAGTCAAT
 GACCTCTGTTACCCAGGGGATTTCATGACTATGAAGAATTGAACACCTATTGAGCAGA
 AIAAACCATTTTGGAGAAAATTCAGATCATCCCCAAAAGTCTTGGTCCAGTCATGAAGCC
 TCATTAGGGGTGAGCTCAGCATGTCCATACCAGAGAAAGTCCCTCTTTTTCAGAAATGTG
 GTATGGCTTATCAAAAAGAACGTACATACCCAAACAATAAGAGGAGCTACAATAATACC
 AACCAGAAGATCTTTTGGTACTGTGGGGGATTACCATCCTAATGATGCGGCAGAGCAG
 ACAAGCTCTATCAAAACCAACCACTATATTTCCGTTGGGACATCAACACTAAACCAG
 AGATTGGTACCAAGAATAGCTACTAGATCCAAAGTAAACGGGCAAGTGGAAGGATGGAG
 TTCTTCTGGACAATTTTAAACCGAATGATGCAATCAACTTCGAGAGTAATGGAAATTC
 ATTGCTCCAGAATATGCATACAAAATTGTCAAGAAAGGGGACTCAACAATTATGAAAAGT
 GAATTGGAATATGGTAACTGCAACACCAAGTGTCAAACCTCAATGGGGGCGATAAATCT
 AGTATGCCATTCCACAATATACACCTCTCACCATCGGGGAATGCCCAAATATGTGAAA
 TCAACAGATTAGTCCTTGGCAGTGGGCTCAGAAATAGCCCTCAAAGAGAGAGAAGAAGA
 AAAAGAGAGGATTATTTGGAGCTATAGCAGGTTTTATAGAGGGAGGATGGCAGGGAATG
 GTAGATGGTTGGTATGGGTACCACCATAGCAATGAGCAGGGGAGTGGGTACGCTGCAGAC
 AAAGAATCCACTCAAAAGGCAATAGATGGAGTCACCAATAAGGTCAACTCGATCATTGAC
 AAAATGAACACTCAGTTTGGAGCCGTGGGAAGGGAATTTAACAACCTAGAAAAGGAGAATA
 GAGAATTTAAACAAGAAGATGGAAGACGGGTTCCTAGATGCTGGACTTATAATGCTGAA
 CTTCTGGTTCTCATGGAATGAGAGAACTCTAGACTTTTCATGACTCAAATGTCAAGAAC
 CTTTACGACAAGGTCCGACTACAGCTTAGGGATAATGCAAAGGAACGGGTAAACGGTTGT
 TTCGAGTTCTATCATAAATGTGATAATGAATGTATGGAAGTGTAAGAAACGGAACGTAT
 GACTACCCGAGTATTCAGAAGAAGCAAGACTAAAAAGAGAGGAAATAAGTGGAGTAGGG
 CATGCATTAGCCTATGGAAGTCAGGGTGATCTTAATCCATTAATTAATGAAATCAGCAAA
 ATCATTTCAGCTGCAGGTAGCTTCGATGTTAAAGAGGAAAGAACTGCAGCTTCTTTATTG
 CAGTTGTCCGTAATGCCAGTGATTTTTCATATGGACGGAACCTCAATAACCCCTGACCACA
 TCAGCATAA

Фиг. 16



Фиг. 17

Вектор pMKhly1 (полная последовательность)

ЛОКУС рМО Kan 12672 пары осн. ДНК КОЛЬЦЕВАЯ SYN 13
ноября 2006 г.
ОПРЕДЕЛЕНИЕ рМО Kan секретирующий вектор
ВВОД рМО Kan
КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА -
ИСТОЧНИК Неизвестен
ОРГАНИЗМ Неизвестен
Неклассифицирован
ЭТАЛОН 1 (основания 1-12672)
АВТОРЫ лично
ЖУРНАЛ не опубликовано
СВОЙСТВА Местоположение/Классификаторы

Кодоны 2503..3015/ген="HlyC"
Кодоны 3027..3128/ген="5hlyA nter"
Кодоны 3120..3311/ген="3'hlyA"/продукт="hlyA"
Кодоны 3380..5506/ген="3'hlyB/продукт="hlyB"
Кодоны 5525..6961/ген="3'hlyD"/продукт="hlyD"
Кодоны комплемент (11-29..11823)/ген="KM-Res"
ЧИСЛО ОСНОВАНИЙ 3420 а 2832 с 3095 g 3325 t
НАЧАЛО

```

1  GAATTCCAAG CGAAGTCCAT CCCCCTCCCT CTTGATTACA AGGGTGATAA TTATTATTCG
61  CATTTGTGTG GTAATGGGAT AGAAAGGAAT GGATAGAAAA AGAACAAAAT TAGTATAGCA
121 ATAGATATGC CCACTGCATT GAATACCTTAC AGGGCATTAT TTTATTATGT TTAAATTGAA
181 GTGGTCTCTG GTTTGATTTA TTTGTTATTC AAGGGGGCTG TTTGGAGATC GGAAAAATCT
241 GTACGTAAAG TGTATTATTT AACCAGTTTC GATGCGTAAC AGATTGATTT TGCGTCAGCG
301 GTTATCGCTT TTAAGTTGTT GCTCTTGCCT TATCGCGTTT AGGTTATCCG ATTAAAGTCA
361 AATTTCTGTA AAATGCTGTA TAGCGCGGGA GTGCACCTTA TAGCTGTAGG TAAGTATGTT
421 CAAAAAATAG TCTTGCCGTA CAATAATTTT CCATATCCAA ACTCACTCCT TCAAGATTCT
481 GGTCCCGGTT TACGGGTAGT TTCCGGAAGG GCGGTAGCAT GCTGATTCAA ACTGCAAGAT
541 GAAACATTGT CGGAGTTGGA TGGAAATTAAG TCATGGCTAT AGCATTGGG CGTGCAATAC
601 AAAATTGGTC CTCATATTTT AGAGTATGAT TGCATATTCA CTAATATTTT TACTTTCTGA
661 TGCGTGGTGG CATCATGCTT TATGAGATAA ACAATCCTGG TAGACTAGCC CCCTGAATCT
721 CCAGACAACC AATATCACTT ATTTAAGTGA TAGTCTTAAT ACTAGTTTTT AGACTAGTCA
781 TTGGAGAACA GATGATTGAT GTCTTAGGAT CGGAGAAAACG CAGACGCGCT ACTACACAGG
841 AAAAGATCGC TATCGTTCAG CAGAGCTTTG AACC GGGAAT GACGGTCTCC CTTGTTGCCC
901 GGCAACATGG TGTGGCAGCC AGCCAGCTAT TTCTCTGGCG CAAGCAATAC CAGGAGGGAA
961 GTCTTACTGC TGTGGCTGCC GGAGAACAGG TCGTTCCTGC CTCGTAACTT GCTGCCGCCA
1021 TGAAGCAGAT TAAAGAGCTC CAGCGCCTGC TCGGCAAAAA AACGATGGAA AATGAACTCC
1081 TTAAGAAGC CGTTGAATAT GGGCGAGCAA AAAAGTGAT AGCGCACGCG CCCTTATTGC
1141 CCGGGGATGG GGAGTAAGCT TCGTCAGCCG TTGTCTCCGG GTGTCCGCTG CGCAGTTGCA
1201 CGTCATTCTC AGACGAACCG ATGACTGGAA GGACGGCCGC CGCAGCCGTC ACACGGATGA
1261 TACGGATGTG CTTCCGCGTA TACATCATGT TATCGGAGAG CTGCCACAT ATGGTTATCG
1321 TCGGGTATGG GCGCTGCTTC GCAGACAAAC AGAACTTGAT GGTATGCCTG CGATCAATGC
1381 CAAATGTGTT TACCGGATCA TGTGCCAGAA TGCGCTGTGT CTTGAGCGAA AACCCGCTGT
1441 ACCGCCATCG AAACGGGCAC ATACCGGCAG AGTGGCTGTG AAAGAAAGTA ATCAGCGATG

```

Фиг. 18

```

1561 GCTGGACTGC TGTGATCGTG AGGCACTGCA CTGGGCGGTC ACAACGGGTG GCTTCAACAG
1621 TGAAACAGTA CAGGACGTCA TGCTGGGAGC AGTGGAAACG CGCTTTGGCA GCGAGCTTCC
1681 GCGCTCTCCA GTGGAGTGGC TGACGGATAA TGGTTCATGC TACCGGGCGA ATGAAACACG
1741 TCAGTTCGCC AGGATGTGG GACTTGAAAC GAAGAACACG GCAGTGCAGA GTCCGGAGAG
1801 TAACGGAAATA ACAGAGAGCT TCGTGAAAAC GATAAAGCGT GATTACATAA GTATCATGCC
1861 CAAACCAGAC GGGTTAACGG CAGCAAAGAA CCTTGCAGAG GCGTTCGAGC ATTATAACGA
1921 ATGGCATCCG CATAGTGCAG TGGGTATCG CTCGCCACGG GAATATCTGC GGCAGCGGGC
1981 CAGTAATGGG TTAAGTGATA ACAGGTATCT GGAATATAG GGGCAAATCC ACCTGGTCAT
2041 TATCTGGAAT TTGACGAAGT GTGATAACTG GTATAGCCAG ATTAATCTAA ACCTTTGTCT
2101 GACAAAATCA GATAAAGAAG AGTAGTTCAA AAGACAACCT GTGGACTCTC ATTCAGAGAG
2161 ATAGGCGTTA CCAAAATTG TTTGGAACG AACAAAGAAA TTGTATTTGT GTAACATAA
2221 TCTTAATGTA AAATAAAGA CACCAGTTCT GTAGAATATG CTTATTGAAG AGAGTGTAA
2281 AATAATTTTA TATAGATGTT GTACAAAGAA CAGGAATGAG TAATTATTTA TGCTTGATGT
2341 TTTTGGACTC TTGCTTTTTA TAGTTATTAT TTTTAAAGTTA GTCAGCGCAA TAAAAACTTG
2401 CTTTTAATAT TAATGCGAGT TATGACATTA AACGGAAGAA ACATAAAGGC ATATTTTTCG
2461 CACAATATTT AATCATATAA TTTAAGTTGT AGTGAGTTTA TTATGAATAT AAACAAACCA
2521 TTAGAGATTC TTGGGCATGT ATCCTGGCTA TGGGCCAGTT CTCCACTACA CAGAAACTGG
2581 CCAGTATCTT TGTTGCAAT AAATGTATTA CCCGCAATAC AGGCTAACCA ATATGTTTTA
2641 TTAACCCGGG ATGATTACCC TGTCCGCTAT TGTAGTTGGG CTAATTTAAG TTTAGAAAAT
2701 GAAATTAAT ATCTTAATGA TGTACCTCA TTAGTTGCAG AAGACTGGAC TTCAGGTGAT
2761 CGTAAATGGT TCATTGACTG GATTGCTCCT TTCGGGGATA ACGGTGCCCT GTACAAATAT
2821 ATGCGAAAAA AATCCCTGA TGAACATTG AGAGCCATCA GGGTGGATCC CAAAACATCAT
2881 GTTGGTAAAG TATCAGAATT TCATGGAGGT AAAATTGATA AACAGTTAGC GAATAAAATT
2941 TTTAAACAAT ATCACCACGA GTTAATAACT GAAGTAAAAA GAAAGTCAGA TTTTAATTTT
3001 TCATTAACTG GTTAAGAGGT AATTAAATGC CAACAATAAC CACTGCACAA ATTAAAGCA
3061 CACTGCAGTC TGCAAAGCAA TCCGCTGCAA ATAAATTGCA CTCAGCAGGA CAAAGCACGA
3121 AAGATGCATT AGCCTATGGA AGTCAGGGTG ATCTTAATCC ATTAATTAAT GAAATCAGCA
3181 AAATCATTTT AGCTGCAGGT AGCTTCGATG TTAAGAGGA AAGAACTGCA GCTTCTTTAT
3241 TGCAGTTGTC CGGTAATGCC AGTGATTTTT CATATGGACG GAACTCAATA ACCCTGACCA
3301 CATCAGCATA ATATATTAAT TTAATGATA GCAATCTTAC TGGGCTGTGC CACATAAGAT
3361 TGCTATTTTT TTTGGAGTCA TAATGGATTG TTGTCATAAA ATTGATTATG GGTATATACG
3421 CCTGGAGATT TTAGCCCAAT ACCATAACGT CTCGTGTTAA CCGGAAGAAA TTAACATAG
3481 ATTTGATACA GACGGGACAG GTCTGGGATT AACGTCAATG TTGCTTGCTG CGAAATCTTT
3541 AGAACTAAAG GTAAACAGG TAAAAAAAAC AATTGATCGA TTAACTTTA TTTTCTGCC
3601 CGCATTAGTC TGGAGAGAGG ATGGACGTCA TTTTATTCTG ACTAAAAATCA GCÁAAGAAAT
3661 AAACAGATAT CTTATTTTTT ATTTGGAGCA GCGAAATCCC CGTGTICTCG AACAGTCTGA
3721 GTTTGAGGCG TTATATCAGG GGCATATTAT TCTTATTACT TCCCGTCTT CTGTATCCGG
3781 GAAACTGGCA AAATTTGACT TTACCTGGTT TATTCCTGCC ATTATAAAAT ACAGGAGAA
3841 ATTTATTGAA ACCCTTGTTG TATCTGTTTT TTTACAATTA TTGCAATTA TAACCCCTCT
3901 TTTTTCAG GTGGTTATGG ACAAGTATT AGTGACAGG GGGTTTTCAA CCCTTAATGT
3961 TATTACTGTT GCATTATCTG TTGTAGTGGT GTTTGAGATT ATACTCAGCG GTTTAAGAAC
4021 TTACATTTTT GCACATAGTA CAAGTCGGAT TGATGTGAG TTGGGTGCCA AACTCTTCCG
4081 GCATTTACTG GCGTACCAGA TCTCTTATTT TGAGAGTCGT CGTGTGGTG ATACTGTTGC
4141 GAGGGTAAGA GAATTAGACC AGATCCGTAA TTTTCTGACA GGACAGGCAT TAACATCTGT
4201 TTTGGACTTA TTATTTTCAC TCATATTTTT TGCGGTAATG TGGTATTACA GCCCAAAGCT
4261 TACTCTGGTG ATCTTATTTT CGCTGCCTTG TTATGCTGCA TGGTCTGTTT TTATTAGCCC
4321 CATTTTCCGA CGTCGCCTTG ATGATAAGTT TTCACGGAAT GCGGATAATC AATCTTTCCT
4381 GGTGGAATCA GTAACGGCGA TTAACACTAT AAAAGCTATG GCAGTCTCAC CTCAGATGAC
4441 GAACATATGG GACAAACAAT TGGCAGGATA TGTGCTGCA GGCTTTAAAG TGACAGTATT
4501 AGCAACCATT GGTCAACAAG GAATACAGTT AATACAAAAG ACTGTTATGA TCATCAACCT
4561 ATGGTTGGGA GCACACCTGG TTATTTCCGG GGATTTAAGT ATTGGTCAGT TAATTGCTTT
4621 TAATATGCTT GCTGGTCAGA TTGTTGCACC GGTATTTCGC CTGACACAA TCTGGCAGGA
4681 TTTCCAGCAG GTTGGTATAT CAGTTACCCG CCTTGGTGAT GTGCTTAACT CTCCAACCTA
4741 AAGTTATCAT GGGAAACTGA CATTGCCGGA AATTAATGGT GATATCACTT TTCGTAATAT
4801 CCGGTTTCGC TATAAACCTG ATTCTCCGGT TATTTGGAC AATATCAATC TTAGTATTAA
4861 GCAGGGGGAG GTTATTGGTA TTGTCGGACG TTCTGGTTCA GGAAAAAGCA CATTAACTAA
4921 ATTAATTCAA CGTTTTTATA TTCTGAAAA TGGCCAGGTA TTAATTGATG GACATGATCT

```

Фиг. 18 (продолжение)

```

4981 TCGGTGGCT GATCCTAACT GGTACGTCG TCAGGTGGGG GTTGTGTTC AGGACAATGT
5041 GCTGCTTAAT CGCAGTATTA TTGATAATAT TTCACTGGCT AATCCTGGCA TGTCCGTGCA
5101 AAAAGTTATT TAIGCAGCGA AATTAGCAGG CGCTCATGAT TTTATTTCTG ATTTGCGTGA
5161 GGGGTATAAC ACCATTGTCTG GGGAAACAGG GGCAGGATTA TCCGGAGGTC AACGTCAACG
5221 CATCGCAATT GCAAGGGCGC TGGTGAACAA CCCTAAAATA CTCATTTTTC ATGAAGCAAC
5281 CAGTGTCTCTG GATTATGAGT CGGAGCATGT CATCATGCGC AATATGCACA AAATATGTAA
5341 GGGCAGAACG GTTATAATCA TTGCTCATCG TCTGTCTACA GTAAAAAATG CAGACCGCAT
5401 TATTGTCTATG GAAAAAGGGA AAATTGTTGA ACAGGGTAAA CATAAGGAGC TGCTTTCTGA
5461 ACCGGAAAGT TTATACAGTT ACTTATATCA GTTACAGTCA GACTAACAGA AAGAACAGAA
5521 GAATATGAAA ACATGGTTAA TGGGGTTCAG CGAGTTCCTG TTGCGCTATA AACTGTCTG
5581 GAGTGAACA TGGAAAATCC GGAAGCAATT AGATACTCCG GTACGTGAAA AGGACGAAAA
5641 TGAATCTTA CCCGCTCATC TGGAAATTAAT TGAACGCCA GTATCCAGAC GGCCGCGTCT
5701 GGTGCTTAT TTTATTATGG GGTTCCTGGT TATTGCTTTT ATTTTATCTG TTTTAGGCCA
5761 AGTGGAAATT GTTGCCACTG CAAATGGGAA ATTAAACACAC AGTGGGCGTA GTAAAGATAA
5821 TAAACCTATT GAAAACTCAA TAGTTAAAGA AATTATCGTA AAAGAAGGAG AGTCAGTCCG
5881 GAAAGGGGAT GTGTTATTA AGCTTACAGC ACTGGGAGCT GAAGCTGATA CGTTAAAAAC
5941 ACAGTCATCA CTGTTACAGG CCAGGCTGGA ACAAATCCG TATCAAATTC TGAGCAGGTC
6001 AATTGAATTA AATAAACTAC CTGAATAAA GCTTCCTGAT GAGCCTTATT TTCAGAATGT
6061 ATCTGAAGAG GAAGTACTGC GTTAACTTC TTTGATAAAA GAACAGTTTT CCACATGGCA
6121 AAATCAGAAG TATCAAAAAG AACTGAATTT GGATAAGAAA AGAGCAGAGC GATTAAACAGT
6181 ACTTGCCCGT ATAAACCGTT ATGAAAATTT ATCAAGGGTT GAAAAAGGCC GTCTGGATGA
6241 TATCAGTAGT TTATTGCATA AACAGGCAAT TGCAAAACAT GCTGTACTTG AGCAGAGAAA
6301 TAAATATGTC GAAGCAGTAA ATGAATTACG AGTTTATAAA TCACAACTGG AGCAAATTGA
6361 GAGTGAGATA TTGTCTGCAA AAGAAGAATA TCAGCTTGTT ACGCAGCTTT TAAAAAATGA
6421 AATTTTAGAT AAGCTAAGAC AAACAACAGA CAACATTGGG TTATTAATC TGGAATTAGC
6481 GAAAAATGAA GAGCGTCAAC AGGCTTCAGT AATCAGGGCC CAGTTTCGG GAAAAGTTCA
6541 GCAACTGAAG GTTCATACTG AAGGTGGGGT TGTTACAACA CCGGAAACAC TGATGGTCAT
6601 CGTTCCGGAA GATGACACGC TGGAGGTAC TGCTCTGGTA CAAAATAAAG ATATTGGTTT
6661 TATTAACGTC GGGCAGAATG CCATCATTAA AGTGGAGGCA TTTCTTATA CACGATATGG
6721 TTATCTGGTG GGTAAAGTGA AAAATATAAA TTTAGATGCA ATAGAAGACC AGAGACTGGG
6781 ACTTGTTTTT AATGTTATTA TTTCTATTGA AGAGAATTGT TTGTCAACCG GGAATAAAAA
6841 CATTCCATTA AGCTCGGGTA TGCGAGTCAC TGCAGAAATA AAGACAGGTA TGCGAAGTGT
6901 AATCAGTTAT CTTCTTAGTC CTTTAGAAGA GTCAGTAAAC GAAAGTTTAC GTGAGCGTTA
6961 AGTTTCAGAA GTCCAGTATT TGCTGCTATA CGTGTGCGT GGCACCTGCC GTCTGAACGG
7021 CATTGATCCG GAAGCCAAGT CAAACAACAG CGTGATGAGC GTCAGGGCAA AACACCAAGG
7081 CTCTCTCGAT GACACCAGAA CAAATTGAAA TACGTGAGCT GAGGAAAAAG CTACCGAGTT
7141 CTTGATGTTG GACTCCCTGA ACAGTTCTCT GTAATCGGGA AACTCAGGAC GCGTTATCCT
7201 GTGGTCACAC TCTGCCATGT GTTTAGGGTT CATCACAGCA GCTACAGATA CTGGTAAAAC
7261 CGTCTGAAA AACCAGACGG CAGACGGGCT GTATTACGTA GTCAGGTAAT TGAGCTACAT
7321 GGCATCAGTC ACGGTTTGGC CGGAGCAAGA CGTATCACC CAATGGCAAC CCGGAGAGGT
7381 GTCAGCGCCA GTGATATAAG ACGGTTAAGC GTTAAAAATC GTGGCGTTGA CAACATCCCA
7441 GTGGACTGAG GTCACACAGG CTTGGCAGCA TTCTCTTCC GGCCGGATGA CCCGGATTTC
7501 ACGGGGAAAG TACGCCGATA ACAGTTTACG GGCTGAAGAT TGCGGTAGGG AGGATAGCAG
7561 ACGTTTTGCC GCCCCCATTT TCTGGAGTTG GGTGAGAAGG CATCATTTCA CCAACACCAA
7621 CATTTCACAG TTACACCCCA CAGCTACATG AAGCGCTTCC ATGAATTATC GCTTTGATTT
7681 ATCATGTTAA AATAGCTCTA CACGGTTGGT TCAGGATTGC GCACCGAAAC CCTCTAAAAT
7741 CCACTGACGC GCCTGCGAAT TATCCAGCAC CGCGCTTTTC GAGATCCTCT ACGCCGGACG
7801 CATCGTGGCC GGCATCACCG GCGCCACAGG TCGGTTGCT GCGCCTATA TCGCCGACAT
7861 CACCGATGGG GAAGATCGGG CTCGCCACTT CGGGCTCATG AGCGCTTGT TCGCGGTGGG
7921 TATGGTGGCA GGCCCCGTGG CCGGGGGACT GTTGGGCGCC ATCTCCTTGC ATGCACCAAT
7981 CCTTGGCGCG GCGGTGCTCA ACGGCCICAA CCTACTACTG GGCTGCTTCC TAAATGAGGA
8041 GTCGCATAAG GGAGAGCGTC GACCGATGCC CTTGAGAGCC TTCAACCCAG TCAGCTCCTT
8101 CCGGTGGGCG CGGGGCATGA CTATCGTCGC CGCATTATG ACTGTCTTCT TTATCATGCA
8161 ACTCGTAGGA CAGGTGCCGG CAGCGCTCTG GGTCAATTTT GCGGAGGACC GCTTTCTGCTG
8221 GAGCGCGACG ATGATCGGCC TGTCGCTTGC GGTATTCGGA ATCTTGACAG CCTTCGCTCA
8281 AGCCTTCGTC ACTGGTCCCG CCACCAAACG TTTCCGCGAG AAGCAGGCCA TTATCGCCCG
8341 CATGGCGGCC GACGCGCTGG GCTACGTCTT GCTGCGGTTT GCGACGCGAG GCTGGATGGC

```

Фиг. 18 (продолжение)

8401 CTTCCCCATT ATGATTCTTC TCGCTTCCGG CCGCATCGGG ATGCCCCCGT TGCAGGCCAT
 8461 GCTGTCCAGG CAGGTAGATG ACGACCATCA GGGACAGCTT CAAGGATCGC TCGCGGCTCT
 8521 TACCAGCCTA ACTTCGATCA TTGGACCGCT GATCGTCACG GCGATTTATG CCGCCTCGGC
 8581 GAGCACATGG AACGGGTGG CATGGATTGT AGGCGCCGCC CTATACCTTG TCTGCCCTCC
 8641 CGCGTTGCGT CGCGGTGCAT GGAGCCGGGC CACCTCGACC TGAATGGAAG CCGCGCGCAC
 8701 CTCGCTAACG GATTCAACCAC TCCAAGAATT GGAGCCAATC AATTCTTGGC GAGAAGTGTG
 8761 AATGCGCAAA CCAACCCTTG GCAGAACATA TCCATCGCGT CCGCCAICTC CAGCAGCCGC
 8821 ACGCGGCGCA TCTCGGGCAG CGTTGGGTCC TGGCCACGGG TGGCGATGAT CGTGCTCCTG
 8881 TCGTTAGGA CCCGGCTAGG CTGGCGGGGT TGCCTTACTG GTTAGCAGAA TGAATCACC
 8941 ATACGCGAGC GAACGTGAAG CGACTGCTGC TGCAGTAACG CTGCGACCTG AGCAACAACA
 9001 TGAATGGTCT TCGGTTTCCG TGTTTCGTAA AGTCTGGAAG CCGGGAAGTC AGCGCCCTGC
 9061 ACCATTATGT TCCGGATCTG CATCGCAGGA TGCTGCTGGC TACCTGTGG AACACCTACA
 9121 TCTGTATTAA CGAAGCGCTG GCATTGACCC TGAGTGATTT TTCTCTGGTC CCGCCGCATC
 9181 CATACCGCCA GTTGTTTACC CTCACAACGT TCCAGTAACC GGGCATGTTC ATCATCAGTA
 9241 ACCCGTATCG TGAGCATCCT CTCTCGTTTC ATCGGTATCA TTACCCCAT GAACAGAAAT
 9301 CCCCTTACA CGGAGGCATC AGTGACCAA CAGGAAAAA CCGCCCTTAA CATGGCCCGC
 9361 TTTATCAGAA GCCAGACATT AACGCTTCTG GAGAACTCA ACGAGCTGGA CGCGGATGAA
 9421 CAGGCAGACA TCTGTGAATC GCTTCACGAC CACGCTGATG AGCTTTACCG CAGCTGCCCTC
 9481 GCGCGTTTCG GTGATGACGG TGAACACCTC TGACACATGC AGCTCCCGGA GACGGTCACA
 9541 GCTTGTCTGT AAGCGGATGC CCGGAGCAGA CAAGCCCGTC AGGCGCGCTC ACGGGGTGTT
 9601 GGGGGGTGTC GGGGCGCAGC CATGACCCAG TCACGTAGCG ATAGCGGAGT GTATACTGGC
 9661 TTAATATGC GGCATCAGAG CAGATTGTAC TGAGAGTGCA CCAATATGCG TGTGAAATAC
 9721 CGCACAGATG CGTAAGGAGA AAATACCGCA TCAGGCGCTC TTCCGCTTCC TCGCTCACTG
 9781 ACTCGCTGCG CTCGGTCTGT CGGCTGCGGC GAGCGGTATC AGCTCACTCA AAGGCGGTAA
 9841 TACGGTTATC CACAGAATCA GGGGATAACG CAGGAAAGAA CATGTGAGCA AAAGGCCAGC
 9901 AAAAGGCCAG GAACCGTAAA AAGGCCGCGT TGCTGCGGTT TTTCCATAGG CTCGCCCCCC
 9961 CTGACGAGCA TCACAAAAAT CGACGCTCAA GTGAGAGGTG GCGAAACCCG ACAGGACTAT
 10021 AAAGATACCA GCGGTTTCCC CCTGGAAGCT CCCTCGTGCG CTCTCCTGTT CCGACCTGTC
 10081 CGCTTACCGG ATACCTGTCC GCCTTTCTCC CTTCCGGGAG CGTGGCGCTT TCTCATAGCT
 10141 CACGCTGTAG GTATCTCAGT TCGGTGTAGG TCGTTCGCTC CAAGCTGGGC TGTGTGACG
 10201 AACCCCCCGT TCAGCCCGAC CGCTGCGCCT TATCCGGTAA CTATCGTCTT GAGTCCAACC
 10261 CGGTAAAGCA CGACTTATCG CCACTGCGAG CAGCCACTGG TAACAGGATT AGCAGAGCGA
 10321 GGTATGTAGG CCGTGCTACA GAGTTCTTGA AGTGGTGGCC TAACTACGGC TACACTAGAA
 10381 GGACAGTATT TGGTATCTGC GCTCTGCTGA AGCCAGTTAC CTTCCGAAAA AGAGTTGGTA
 10441 GCTCTTGATC CGGCAAAACAA ACCACCGCTG GTAGCGGTGG TTTTTTTGTT TGAAGAGCAG
 10501 AGATTACGCG CAGAAAAAAA GGATCTCAAG AAGATCCTTT GATCTTTTCT ACGGGGTCTG
 10561 ACGCTCAGTG GAACGAAAAAC TCACGTTAAG GGATTTTGGT CATGAGATTA TCAAAAAGGA
 10621 TCTTCACCTA GATCCTTTTA AATTAATAAT GAAGTTTAA ATCAATCTAA AGTATATATG
 10681 AGTAAACTTG GTCTGACAGT TACCAATGCT TAATCAGTGA GGCACCTATC TCAGCGATCT
 10741 GTCTATTTCC TTATCCATA GTTGCCTGAC TCCCATATG AATATCCTCC TTAGTTCCCTA
 10801 TTCCGAAGTT CCTATTCTCT AGAAAGTATA GGAACCTCAG AGCGCTTTTG AAGCTGGGGT
 10861 GGGCGAAGAA CTCCAGCATG AGATCCCGC GCTGGAGGAT CATCCAGCGG CGTCCCGGA
 10921 AAACGATTCC GAAGCCCAAC CTTTCATAGA AGGCGGCGGT GGAATCGAAA TCTCGTGATG
 10981 GCAGGTGGG CGTCGCTTGG TCGGTCAATT CGAACCCAG AGTCCCGCTC AGAAGAACTC
 11041 GTCAAGAAGG CGATAGAAGG CGATGCGCTG CGAATCGGGA GCGGCGATAC CGTAAAGCAC
 11101 GAGGAAGCGG TCAGCCCAT TCGCGCCAAG CTCTTCAGCA ATATCACGGG TAGCCAACGC
 11161 TATGTCTTGA TAGCGTCCG CCACACCCAG CCGGCCACAG TCGATGAATC CAGAAAAGCG
 11221 GCCATTTTCC ACCATGATAT TCGCAAGCA GGCATCGCCA TGGGTACAGA CGAGATCCTC
 11281 GCCGTGCGGC ATGCGCGCCT TGAGCCTGGC GAACAGTTCC GCTGGCGCGA GCCCTGATG
 11341 CTCTTCGTCC AGATCATCCT GATCGACAAG ACCGGCTTCC ATCCGAGTAC GTGCTCGCTC
 11401 GATGCGATGT TTCGCTTGGT GGTGGAATGG GCAGGTAGCC GGATCAAGCG TATGCAGCGG
 11461 CCGCATTTGA TCAGCCATGA TGGATACTTT CTCGGCAGGA GCAAGGTGAG ATGACAGGAG
 11521 ATCCIGCCCC GGCACCTTCG CCAATAGCAG CCAGTCCCTT CCGGCTTCAG TGACAACGTC
 11581 GAGCACAGCT GCGCAAGGAA CGCCCGTCGT GGCCAGCCAC GATAGCCCGG CTGCTCGTCTC
 11641 CTGCAGTTCA TTCAGGGCAC CGGACAGGTC GGTCTTGACA AAAAGAACCG GCGCCCTG
 11701 CGCTGACAGC CGGAACACGG CCGCATCAGA GCAGCCGATT GTCTGTTGTG CCCAGTCATA
 11761 GCCGAATAGC CTCTCCACCC AAGCGGCCGG AGAACCTGCG TGCAATCCAT CTTGTTCAAT

Фиг. 18 (продолжение)

```

11821 CATGCGAAAC GATCCTCATC CTGTCTCTTG ATCAGATCTT GATCCCCTGC GCCATCAGAT
11881 CCTTGGCGGC AAGAAAGCCA TCCAGTTTAC TTTGCAGGGC TTCCCAACCT TACCAGAGGG
11941 CGCCCCAGCT GGCAATTCCG GTTCGCTTGC TGTCCATAAA ACCGCCCAGT CTAGCTATCG
12001 CCATGTAAGC CCACTGCAAG CTACCTGCTT TCTCTTTGCG CTTGCGTTTT CCCTTGTCCA
12061 GATAGCCCAG TAGCTGACAT TCATCCGGGG TCAGCACCGT TTCTGCGGAC TGGCTTTCTA
12121 CGTGTTCCGC TTCCTTTAGC AGCCCTTGCG CCTGAGTGC TTGCGGCAGC GTGGGGGATC
12181 TTGAAGTTCC TATTCCGAAG TTCCTATTCT CTAGAAAAGTA TAGGAACTTC GAAGCAGCTC
12241 CAGCCTACAC CAAAAAAGGG AATAAGGGCG ACACGGAAAT GTTGAATACT CATACTCTTC
12301 CTTTTTCAAT ATTATTGAAG CATTTATCAG GGTATTGTC TCATGAGCGG ATACATATTT
12361 GAATGTATTT AGAAAAATAA ACAAATAGGG GTTCCGCGCA CATTTCCCCG AAAAGTGCCA
12421 CCTGACGTCT AAGAAACCAT TATTATCATG ACATTAACCT ATAAAAATAG GCGTATCACG
12481 AGGCCCTTTC GTCTTCAAGA ATTCTCATGT TTGACAGCTT ATCATCGATG GACATTATTT
12541 TTGTGGAGCC GGAGGAAACA GACCAGACGG TTCAGATGAG GCGCTTACCA CCAGAACCGC
12601 TGTGTCCCA CCATTCTGGC GATTCCCAA CGCTATTTGG ATAAAAAGTA GCCTTAACGT
12661 GGTTTATTTT CC

```

Фиг. 18 (продолжение)