



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(51) МПК

C12N 15/70 (2006.01)

C07K 14/32 (2006.01)

A61K 39/07 (2006.01)

C12N 15/31 (2006.01)

C12N 1/21 (2006.01)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: 2003103779/13, 06.07.2001

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
06.07.2001

(30) Приоритет: 08.07.2000 GB 0016702.3

(43) Дата публикации заявки: 20.08.2004

(45) Опубликовано: 27.02.2006 Бюл. № 6

(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: BROSSIER F. et. al. Role of toxin
functional domains in anthrax pathogenesis,
Infection and Immunity, 2000,68,4, p.1781-
1786. WO 0002522 A, 20.01.2000. RU 2115433
C1, 20.07.1998. US 5677274 A, 14.10.1997.(85) Дата перевода заявки РСТ на национальную
фазу: 10.02.2003(86) Заявка РСТ:
GB 01/03065 (06.07.2001)(87) Публикация РСТ:
WO 02/04646 (17.01.2002)Адрес для переписки:
129010, Москва, ул. Б.Спасская, 25, стр.3,
ООО "Юридическая фирма Городисский и
Партнеры", пат.пов. Е.Е.Назиной

(72) Автор(ы):

УИЛЛЬЯМСОН Этел Дайан (GB),
МИЛЛЕР Джули (GB),
УОЛКЕР Никола Джейн (GB),
БЭЙЛЛИ Лесли Вилльям Джеймс (GB),
ХОЛДЕН Паула Томсон (GB),
ФЛИК-СМИТ Хелен Клэйр (GB),
БАЛЛИФЕНТ Хелен Лайза (GB),
ТИТБОЛЛ Ричард Вилльям (GB),
ТОППИНГ Эндрю Вилльям (GB)

(73) Патентообладатель(и):

ДЗЕ СЕКРЕТЭРИ ОФ СТЕЙТ ФОР ДЕФЕНС
ДСТЛ (GB)

(54) ИММУНОГЕННЫЙ ПОЛИПЕПТИД, ВЫЗЫВАЮЩИЙ ЗАЩИТНЫЙ ИММУННЫЙ ОТВЕТ ПРОТИВ *VACILLUS ANTHRACIS* (ВАРИАНТЫ), СПОСОБ ЕГО ПОЛУЧЕНИЯ, НУКЛЕИНОВАЯ КИСЛОТА, КОДИРУЮЩАЯ ЕГО, ВЕКТОР ДЛЯ ЭКСПРЕССИИ (ВАРИАНТЫ), СПОСОБ И ВАКЦИНА ДЛЯ ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ ИНФЕКЦИИ, ВЫЗВАННОЙ *VACILLUS ANTHRACIS*

(57) Реферат:

Изобретение относится к биотехнологии, в частности к геной инженерии. Разработан способ получения иммуногенного полипептида, вызывающего иммунный ответ, который является защитным ответом против инфицирования *Bacillus anthracis*. Предложенный иммуногенный полипептид содержит от одного до трех доменов полноразмерного Защитного Антигена (РА) из *B. anthracis* или их варианты, и, по меньшей мере, один из указанных доменов является доменом 1 или доменом 4 из РА или его вариантом. Данные варианты иммуногенного полипептида, а также

полноразмерный РА продуцируются в результате экспрессии в *E.coli*. Также предложен вектор для экспрессии в бактериальных клетках, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую упомянутый выше иммуногенный полипептид. Разработан способ предупреждения инфекции, вызванной *B. anthracis* за счет введения достаточного количества иммуногенного полипептида. Предложена также вакцина для предупреждения инфекции, вызываемой *B. anthracis*, содержащая эффективное количество иммуногенного полипептида и подходящий носитель. Данное изобретение позволяет получить эффективное

средство для предупреждения инфекции,
вызываемой *B. anthracis*. 9 н. и 13 з.п. ф-лы, 5

ил., 3 табл.

R U 2 2 7 0 8 6 5 C 2

R U 2 2 7 0 8 6 5 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

(51) Int. Cl.

C12N 15/70 (2006.01)*C07K 14/32* (2006.01)*A61K 39/07* (2006.01)*C12N 15/31* (2006.01)*C12N 1/21* (2006.01)(12) **ABSTRACT OF INVENTION**(21), (22) Application: **2003103779/13, 06.07.2001**(24) Effective date for property rights: **06.07.2001**(30) Priority: **08.07.2000 GB 0016702.3**(43) Application published: **20.08.2004**(45) Date of publication: **27.02.2006 Bull. 6**(85) Commencement of national phase: **10.02.2003**(86) PCT application:
GB 01/03065 (06.07.2001)(87) PCT publication:
WO 02/04646 (17.01.2002)

Mail address:

**129010, Moskva, ul. B.Spasskaja, 25, str.3,
OOO "Juridicheskaja firma Gorodisskij i
Partnery", pat.pov. E.E.Nazinoj**

(72) Inventor(s):

**UILL'JaMSON Ehtel Dajan (GB),
MILLER Dzhuli (GB),
UOLKER Nikola Dzhejn (GB),
BEhJLLI Lesli Vill'jam Dzhejms (GB),
KhOLDEN Paula Tomson (GB),
FLIK-SMIT Khelen Klehjr (GB),
BALLIFENT Khelen Lajza (GB),
TITBOLL Richard Vill'jam (GB),
TOPPING Ehndrju Vill'jam (GB)**

(73) Proprietor(s):

**DZE SEKRETEhRI OF STEJT FOR DEFENS
DSTL (GB)**

(54) **IMMUNOGENIC POLYPEPTIDE INDUCING PROTECTIVE IMMUNE RESPONSE AGAINST BACILLUS ANTHRACIS (VARIANTS), METHOD FOR ITS PREPARING, NUCLEIC ACID ENCODING THEREOF, EXPRESSION VECTOR (VARIANTS), METHOD AND VACCINE FOR PROPHYLAXIS OF INFECTION CAUSED BY BACILLUS ANTHRACIS**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology, molecular biology, microbiology, genetic engineering.

SUBSTANCE: invention relates to a method for preparing an immunogenic polypeptide inducing immune response that represents the protective response against infection with Bacillus anthracis. Proposed immunogenic polypeptide comprises from one to three domains of the full-scale Protective Antigen (PA) from B. anthracis or their variants and at least one of indicated domains represents domain 1 or domain 4 from PA or its variant. These variants of immunogenic polypeptide and full-scale PA are produced as result of expression in E. coli. Also, invention proposes a vector for expression in bacterial

cells that comprises nucleic acid encoding abovementioned immunogenic polypeptide. Also, invention the developed method for prophylaxis of infection caused by B. anthracis based on administration of sufficient amount of immunogenic polypeptide. Also, invention proposes a vaccine for prophylaxis of infection caused by B. anthracis that comprises the effective amount of immunogenic polypeptide and a suitable carrier. Invention provides preparing the effective agent used for prophylaxis of infection caused by B. anthracis.

EFFECT: improved preparing method and valuable properties of polypeptide and vaccine.

22 cl, 5 dwg, 3 tbl, 6 ex

Изобретение относится к полипептидам, которые вызывают иммунный ответ, который является защитным от инфицирования *Bacillus anthracis*, к способам их получения, к рекомбинантным клеткам *Escherichia coli*, используемым в этих способах, а также к используемым нуклеиновым кислотам и к трансформирующим векторам.

5 Существующие системы экспрессии Защитного Антигена (РА) для вакцинных систем в качестве экспрессионного хозяина используют дефицитный по протеазе *Bacillus subtilis*. Несмотря на то, что такие системы являются подходящими с точки зрения количественной характеристики и чистоты продукта, у них имеются и существенные недостатки. Во-первых, регуляторные системы, как правило, чужды данному хозяину, и это может
10 тормозить экспрессию. Более существенный момент заключается в том, что используемые в настоящее время штаммы *Bacillus subtilis* образуют термостабильные споры, для которых нужно использовать специально для этого предназначенное растение.

В частности, в WO 00/02522 описываются репликоны VEE-вируса, которые экспрессируют РА или некие иммуногенные фрагменты.

15 Бактерия *E. coli* хорошо известна в качестве экспрессионной системы для ряда человеческих вакцин. Несмотря на способность *E. coli* легко ферментировать при очень высоких клеточных плотностях делает данную бактерию идеальным хозяином для экспрессирования многих белков, предшествующие попытки экспрессировать и выделить рекомбинантный РА из цитозоля *E. coli* затруднялись из-за низкого выхода белка и
20 протеолитической деградации (Singh и соавт., *J. Biol. Chem.* (1989) 264; 11099-11102, Vodkin, и соавт., *Cell* (1993) 34; 693-697 и Sharma с соавт., *Protein Expr. purif.* (1996), 7, 33-38).

Недавно описан подход к сверхэкспрессированию РА в цитозоле *E. coli* в виде стабильного растворимого белка (Willhite с соавт., *Protein and Peptide Letters*,
25 (1998), 5; 273-278). Примененный подход является одним из повышающих сродство tag-последовательности к N-концу РА, что позволяет получить простую систему выделения очисткой.

Трудность, присущая данной системе, заключается в том, что она нуждается в применении дополнительной вспомогательной технологической стадии для того, чтобы
30 удалить tag-метку перед использованием РА.

Оптимизация кодона представляет собой методику, которая ныне хорошо известна и используется для конструирования искусственных генов. Существует некоторая избыточность генетического кода, поскольку большинство аминокислот кодируется более чем одной кодоновой последовательностью. Разные организмы предпочтительно
35 используют тот или иной из этих отличающихся кодонов. Следует ожидать, что в результате оптимизации кодонов уровни экспрессии отдельных белков будут возрастать.

Как правило, это желательно, кроме случая с РА, когда повышенные уровни экспрессии будут приводить к протеолитической деградации и/или клеточной токсичности. В таких случаях возрастание уровней экспрессии может оказаться контрпродуктивным и привести к
40 существенной клеточной токсичности.

Вместе с тем, к удивлению заявителей они обнаружили, что этого не происходит в случае с *E. coli*, и что в данной системе оптимизация кодона ведет к неожиданно высоким уровням экспрессии рекомбинантного РА, независимо от наличия или отсутствия протеолитических ферментов у данного штамма.

45 Кроме того, очевидно, что экспрессия защитного домена из РА не подавляет экспрессию в *E. coli*.

Была выяснена кристаллическая структура нативного РА (Petosa С. и соавт. *Nature* 385: 833-838, 1997) и было показано, что РА состоит из четырех разных и функционально независимых доменов: домена 1, разделенного на 1a, 1-167 аминокислот, и 1b, 168-258
50 аминокислот; домена 2, 259-487 аминокислот; домена 3, 488-595 аминокислот и домена 4, 596-735 аминокислот.

Заявители установили, что некоторые домены, при их индивидуальном использовании, при использовании в слитых белках или в сочетании друг с другом, по всей вероятности,

оказывают удивительно выраженные защитные эффекты.

В соответствии с настоящим изобретением, создали иммуногенный реагент, который вызывает иммунный ответ, который защищает от *Bacillus anthracis*, причем указанный реагент включает в себя один или несколько полипептидов, которые вместе представляют до трех доменов полноразмерного Защитного Антигена (РА) из *B. anthracis* или их варианты, и по меньшей мере один из указанных доменов включает в себя домен 1 или домен 4 РА или их варианты.

В данном случае этот реагент должен включать в себя смесь полипептидов или слитых пептидов, в которой отдельные полипептиды включают в себя один или несколько индивидуальных доменов РА.

В частности, данный реагент содержит полипептид(ы), включающий в себя домен 1 или домен 4 РА или его вариант в виде, отличающемся от полноразмерного РА. В данном случае домены представлены, соответственно, полностью, в частности, домен 1 представлен в его полноте.

Используемый здесь термин "полипептид" включает в себя белки и пептиды.

Используемый здесь экспрессионный "вариант" относится к последовательностям аминокислот, которые отличаются от базовой последовательности тем, что одна или несколько аминокислот в данной последовательности делегированы или замещены другими аминокислотами, но которые все еще производят иммунный ответ, который защищает от *Bad 11 us anthracis*. Аминокислотные замены могут рассматриваться в качестве "консервативных", если та или иная аминокислота заменена отличающейся аминокислотой, в общем, с аналогичными свойствами. Неконсервативные замены - это такие замены, когда аминокислоты заменяются аминокислотами другого типа. В общих чертах, немногочисленные неконсервативные замены будут возможны без изменения биологической активности данного полипептида. Соответствующие варианты должны быть идентичны по меньшей мере на 60%, предпочтительно идентичны по меньшей мере на 75%, и более предпочтительно идентичны по меньшей мере на 90% последовательности РА.

Идентичность отдельной вариантной последовательности РА можно определить, в частности, с использованием метода множественного выравнивания, описанного Lipman и Pearson (Lipman, D.J. & Pearson, W.R. (1985) Rapid and Sensitive Protein Similarity Searches, Science, vol.227, pp.1435-1441). "Оптимизированная" процентная оценка должна быть вычислена по алгоритму Lipman-Pearson с помощью нижеследующих параметров:

$ktup = 1$, штраф за пробел = 4 и штраф за длину пробела = 12. Последовательности, для которых оценивается сходство, должны использоваться в качестве "тест-последовательности", то есть, базовую последовательность для сравнения, (SEQ ID NO 1), необходимо первой включить в данный алгоритм.

Предпочтительно, если реагент согласно изобретению включает в себя полипептид, который обладает последовательностью домена 1 и/или домена 4 из РА дикого типа.

Наиболее предпочтительный вариант осуществления настоящего изобретения включает в себя домен 4 из РА *B. anthracis*.

Эти домены содержат следующие последовательности, представленные в нижеследующей Таблице 1.

Таблица 1	
Домен	Аминокислоты полноразмерного РА*
4	596-735
1	1-258

Эти номера аминокислот относятся к последовательности, которая приведена у Welkos с соавт. Gene 69 (1988) 287-300, и представлены ниже, соответственно, в виде SEQ ID No 15 (Фиг.4) и 3 (Фиг.3).

Домен 1 содержит две области, обозначаемые 1a и 1b. Область 1a включает в себя

аминокислоты 1-167, а область 1b состоит из аминокислот 168-258. По-видимому, область 1a существенна для получения хорошего защитного ответа, и данный полный домен может быть предпочтительным.

В наиболее предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения сочетание доменов 1 и 4 или их защитных областей используется в качестве иммуногенного реагента, который обуславливает возрастание иммунного защитного ответа на *B.anthraxis*. Данное сочетание, например в виде химерного (гибридного) пептида, может быть экспрессировано с использованием экспрессионной системы согласно изобретению, которая вкратце изложена ниже.

При использовании домена 1 он соответствующим образом сливается с доменом 2 последовательности PA, но, по-видимому, предпочтительно сливается с доменом 2 и доменом 3.

Такого рода сочетания и их использование для профилактики и терапии создает еще один аспект настоящего изобретения.

Соответственно вышеописанные домены являются частью слитого, (химерного или гибридного) белка, предпочтительно с N-концевым глутатион-S-трансферазным белком (GST). Белок GST не только содействует очистке слитого белка, но может также создавать адъювантное (иммуностимулирующее) действие, вероятно, в результате увеличения его размера.

Полипептиды согласно изобретению получают соответствующими традиционными способами. Например, их можно синтезировать или они могут быть получены с использованием техники рекомбинантных ДНК. В частности, нуклеиновые кислоты, которые кодируют указанные домены, включают в себя экспрессионный вектор, который используют для трансформации хозяйской клетки. Затем традиционными способами можно осуществить культивирование данной хозяйской клетки с последующим выделением нужного полипептида. Нуклеиновые кислоты, векторы и трансформированные клетки, используемые в данных способах, создают дополнительный аспект настоящего изобретения.

Вообще используемые хозяйские клетки должны представлять собой такие клетки, которые традиционно используются для получения PA, например *Bacillus subtilis*.

Заявители неожиданно обнаружили, что домены, по отдельности или в сочетании, при определенных условиях могут успешно экспрессироваться в *E.coli*.

Итак, в настоящем изобретении разработан способ получения иммуногенного полипептида, который вызывает иммунный ответ, который является защитным против *B.anthraxis*, причем указанный способ включает в себя трансформирование хозяйской *E.coli* с помощью нуклеиновой кислоты, которая кодирует либо (а) защитный антиген (PA) из *Bacillus anthracis* или его вариант, который может вызвать защитный иммунный ответ, либо (b) полипептид, включающий в себя по меньшей мере один защитный домен данного защитного антигена (PA) из *Bacillus anthracis* или его вариант, который может вызвать защитный иммунный ответ, что описано выше, культивирование трансформированного хозяина и извлечение из него данного полипептида, при условии, что в тех случаях, когда данный полипептид представляет собой защитный антиген (PA) из *Bacillus anthracis* или его вариант, который может вызывать защитный иммунный ответ, процентная доля гуанидиновых и цитозиновых остатков в указанной нуклеиновой кислоте превышает 35%.

С использованием этих вариантов и с применением подходящего экспрессирующего хозяина можно добиться высокого выхода продукта.

Таблица, представляющая кодоны и частоты, с которыми они появляются в геномах *Escherichia coli* и *Bacillus anthracis*, приведена на Фиг.1. Ясно, что гуанидин и цитозин встречаются чаще у *E.coli*, чем у *B.anthraxis*. Анализ содержания используемого данного кодона обнаруживает следующее:

Виды	1-я буква кодона GC	2-я буква кодона GC	3-я буква кодона GC	Общее GC-содержание
<i>E.coli</i>	58,50%	40,70%	54,90%	51,37%

B.anthraxis	44,51%	31,07%	25,20%	33,59%
-------------	--------	--------	--------	--------

Таким образом, по-видимому, кодонами, предпочтительно встречающимися у *E.coli*, являются такие кодоны, которые встречаются в себя, по возможности, гуанидин или цитозин.

5 С увеличением процентной доли нуклеотидов гуанидина и цитозина в указанной последовательности, используемой для кодирования иммуногенного белка, сверх того, что обычно обнаруживается в гене *B.anthraxis* дикого типа, использование данного кодона будет улучшать экспрессию в *E.coli*.

10 Соответственно, процентная доля гуанидиновых и цитозиновых остатков в кодирующей нуклеиновой кислоте, используемой в настоящем изобретении, по меньшей мере, в тех случаях, когда данный полипептид представляет собой защитный антиген (PA) *Bacillus anthracis* или его вариант, который может вызывать защитный иммунный ответ, превышает 40%, предпочтительно превышает 45%, и наиболее предпочтительно - превышает 50-52%.

15 Высокие уровни экспрессии защитных доменов могут быть достигнуты при использовании последовательности из *B.anthraxis* дикого типа, кодирующей эти структурные единицы. Однако показатели экспрессии можно дополнительно улучшить путем повышения содержания GC в данной нуклеиновой кислоте, что описано выше.

В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения данный способ включает в себя экспрессию PA *B.anthraxis*.

20 Далее, в соответствии с настоящим изобретением, создали рекомбинантную клетку *Escherichia coli*, которую трансформируют с помощью нуклеиновой кислоты, которая кодирует защитный антиген (PA) из *Bacillus anthracis* или его вариант, который может вызывать защитный иммунный ответ, отличающуюся тем, что процентная доля остатков гуанидина и цитозина в данной нуклеиновой кислоте превышает 35%.

25 Как и раньше, соответствующая процентная доля остатков гуанидина и цитозина в данной кодирующей нуклеиновой кислоте превышает 40%, предпочтительно превышает 45% и наиболее предпочтительно превышает 50-52%,

30 Соответственно, нуклеиновая кислота согласно изобретению, используемая для трансформации клеток *E.coli*, представляет собой синтетический ген. В частности, данная нуклеиновая кислота представляет собой SEQ ID NO 1, которая приведена на Фиг.2, или ее модифицированную форму.

35 Экспрессируемая "модифицированная форма" относится к другим нуклеиновокислотным последовательностям, которые кодируют PA или его фрагменты или варианты, которые вызывают защитный иммунный ответ, но которые используют несколько иные кодоны, обеспечивая выполнение требования о процентном содержании GC в соответствии с настоящим изобретением. Соответствующие модифицированные формы должны быть сходны по меньшей мере на 80%, предпочтительно сходны на 90%, и наиболее предпочтительно сходны по меньшей мере на 95% с SEQ ID NO 1. В частности, данная нуклеиновая кислота включает в себя SEQ ID NO 1.

40 В альтернативном варианте осуществления настоящего изобретения, в настоящем изобретении создали рекомбинантную клетку *Escherichia coli*, которая была трансформирована нуклеиновой кислотой, которая кодирует защитный домен защитного антмгека (PA) из *Bacillus anthracis* или его вариант, который может вызывать защитный иммунный ответ.

45 Предпочтительно, данная нуклеиновая кислота кодирует домен 1 или домен 4 *B.anthraxis*.

50 Далее, в соответствии с настоящим изобретением, разработали способ получения иммуногенного полипептида, который вызывает иммунный ответ, который является защитным от *B.anthraxis*, причем указанный способ включает в себя культивирование клетки, что описано выше, и извлечение нужного полипептида из данной культуры. Такие способы хорошо известны в данной области техники.

В соответствии еще с одним аспектом, в настоящем изобретении создали вектор, трансформирующий *E.coli*, содержащий нуклеиновую кислоту, которая кодирует защитный антиген (PA) из *Bacillus anthracis* или его вариант, который может вызывать защитный

иммунный ответ, отличающийся тем, что процентная доля гуанидиновых и цитозиновых остатков в данной нуклеиновой кислоте превышает 35%.

5 Еще один аспект настоящего изобретения относится к вектору, трансформирующему *E.coli*, и содержащему нуклеиновую кислоту, которая кодирует защитный домен защитного антигена (РА) из *Bacillus anthracis* или его вариант, который может вызывать защитный иммунный ответ.

10 Соответствующие векторы, используемые для трансформации *E.coli*, хорошо известны в данной области техники. Например, Т7-экспрессионная система обеспечивает высокие уровни экспрессии. Но, особенно предпочтительный вектор содержит рAG163, получаемый у Avescia (UK).

Нуклеиновая кислота SEQ ID NO 1, или ее вариант, которая кодирует РА и которая обладает по меньшей мере 35%-ным, предпочтительно по меньшей мере 40%-ным, более предпочтительно - по меньшей мере 45%-ным, и наиболее предпочтительно - 50-52%-ным содержанием GC, создает дополнительный аспект настоящего изобретения.

15 По необходимости указанные варианты РА или домены могут экспрессироваться в виде соединения с другим белком, например с белком, который обеспечивает иную иммунность, с белком, который содействует очистке данного продукта, или с высокоэкспрессируемым белком (напр., тиоредоксин, GST), который гарантирует подходящую инициацию или трансляцию.

20 При необходимости к данной экспрессионной системе следует добавить дополнительные системы, такие как Т7-лизоцим, который улучшает репрессию данной системы, хотя в случае настоящего изобретения трудности, связанные с клеточной токсичностью, не отмечены.

25 В способе согласно изобретению можно использовать любой подходящий штамм *E.coli*. Пригодны штаммы, которые характеризуются недостаточностью по ряду протеаз (например, lon^- , ompT^-), и в отношении которых предполагается, что они должны минимизировать протеолиз. Однако заявители обнаружили, что нет необходимости использовать такие штаммы для достижения хорошего выхода продукта и что другие штаммы, такие как K12, как ни странно, производят большие количества продукта.

30 Ферментация штамма осуществляется, как правило, в стандартных условиях, которые известны в данной области техники. Например, ферментацию можно осуществлять в виде периодических культур, предпочтительно в больших колбах для встряхивания, с использованием сложной среды, содержащей антибиотики для сохранения плазмиды и с добавлением IPTG для индукции.

35 После культивирования клетки собирают и хранят при -20°C до тех пор, пока не потребуется операция по выделению очисткой.

40 Соответствующие схемы выделения очисткой экспрессируемого *E.coli* РА (варианта либо домена) можно адаптировать для схем, используемых для *B.subtilis*. Отдельные используемые стадии выделения очисткой зависят от физических характеристик рекомбинантного РА. Обычно осуществляют разделение с помощью ионообменной хроматографии в условиях, которые позволяют наибольшее дифференциальное связывание с данной колонкой и последующим сбором фракций с небольшим градиентом. В некоторых случаях для получения продукта с нужной технической характеристикой достаточной может оказаться единственная хроматографическая стадия.

45 При необходимости фракции можно анализировать на наличие данного продукта с использованием SDS PAGE или Вестерн-блоттинга.

50 Ниже иллюстрируется осуществление успешного клонирования и экспрессии панели химерных белков, представляющих собой интактные или неполные домены гРА. Иммуногенность и защитную эффективность этих химерных белков от заражения STI-спорами оценивают на модели A/J-мышей.

Все доменные белки гРА оказываются иммуногенными для A/J-мышей и обеспечивают по меньшей мере частичную защиту при заражении по сравнению с контрольными GST-иммунизированными мышами. Белок-переносчик, GST присоединяется к N-концу доменных

белков, не ослабляя иммуногенность слитых белков ни в условиях *in vivo*, что показано на антительном ответе, стимулированном у иммунизированных животных, ни в условиях *in vitro* в виде слитых белков, которые можно детектировать с помощью антисыворотки к rPA после Вестерн-блоттинга, что свидетельствует о том, что GST-метка не препятствует
5 распознаванию rPA-эпитопа. Иммунизация крупными химерными белками дает наивысшие титры. В частности, мыши, иммунизированные полноразмерным химерным белком GST 1-4, в среднем продуцируют антисыворотку rPA с восьмикратной концентрацией по сравнению с группой, иммунизированной rPA (Фигура 5). Иммунизация мышей доменами 1-4 rPA с отщепленным GST дает приблизительно половину титра, продуцируемого при
10 иммунизации указанным химерным белком. Отчего данный слитый белок должен быть гораздо более иммуногенным, остается невыясненным. Возможно, увеличенный размер данного белка может оказывать повышенное иммуногенное действие на иммунные эффектор-ные клетки. Но это не стимулирует такой ответ в такой же степени в других химерных белках, к тому же любое усиливающее иммуногенность действие GST-метки не
15 повышает защиту от заражения, поскольку отщепляемые белки аналогичным образом защищены их химерными аналогами.

Несмотря на наличие высоких титров анти-rPA, в группах животных, иммунизированных с помощью GST1, отщепленного 1, GST1b-2, GST1b-3 и GST1-3, при сниженном уровне заражения 10^2 MLD, имеет место некоторый сбой в защите, и иммунизация этими белками
20 не пролонгирует время выживания тех мышей, которые не выдержали заражения, в отличие от контрольных мышей, иммунизированных GST. Это дает основание полагать, что этот иммунный ответ не был соответствующим образом индуцирован этими белками для достижения полной резистентности к данному заражению. Как было показано в других исследованиях на мышах и морских свинках (Little S.F. и соавт. 1986. *Infect. Immun.* 52: 356-363), не существует точной корреляции между титром антител против PA и защитой от заражения. Тем не менее, для защиты требуется некоторая пороговая величина антител (Cohen S. и соавт., 2000 *Infect. Immun.* 68: 4549-4558), и это
25 заставляет полагать, что клеточно-опосредованные компоненты иммунного ответа также нужны для стимулирования защиты (Williamson 1989).

30 Как свидетельствуют результаты SDS-Page и Вестерн-блоттинга, полученные химерные белки GST1, GST1b-2 и GST1-2 оказались наименее стабильными, что, вероятно, связано с тем, что данные белки, в отсутствие домена 3, более подвержены деградации, и эта нестабильность, возможно, привела к утрате защитных эпитопов.

Определенная структурная конформация данных белков также, по-видимому,
35 существенна для стимуляции защитного иммунного ответа. Удаление из данных химерных белков Домена 1а приводит и к снижению титра антител и к ослаблению защиты при заражении по сравнению с их интактными аналогами GST1-2 и GST1-3. Аналогично этому мыши, иммунизированные с помощью одного лишь GST 1, были лишь частично защищены от заражения, но при объединении с доменом 2, в виде химерного белка GST1-2, отмечена
40 полная защита при уровне заражения 10^2 MLD. Однако иммунный ответ, индуцированный в результате иммунизации с помощью химерного белка GST1-2, был недостаточным для создания полной защиты при более высоком уровне заражения в 10 MLD, что опять-таки могло быть связано с утратой защитных эпитопов в результате деградации данного белка.

Все группы животных, иммунизированные укороченными белками, содержащими домен
45 4, в том числе отдельно взятым GST 4, отдельно взятым отщепленным доменом 4, а также смесью из двух индивидуально экспрессируемых доменов, GST 1 и GST 4, были полностью защищены от заражения STI-спорами при 10^3 MLD (Таблица 1). Brossier с соавт. продемонстрировали снижение защиты у мышей, иммунизированных мутантным штаммом *B. anthracis*, который экспрессирует PA без домена 4 (Brossier F., и соавт. 2000.
50 *Infect. Immun.* 68: 1781-1786), и это было подтверждено в данном исследовании, где иммунизация с помощью GST1-3 приводила к сбою в защите, несмотря на высокие титры антител. Эти данные свидетельствуют, что домен 4 представляет собой иммунодоминантную субъединицу PA. Домен 4 представлен 139 аминокислотами на

карбокси-конце полипептида PA. Он содержит рецепторный участок связывания хозяйской клетки (Little S.F. и соавт., 1996 *Microbiology* 142: 707-715), идентифицированный как находящийся внутри и вблизи малой петли, расположенный между аминокислотными остатками 679-693 (Varughese M., и соавт. 1999 *Infect. Immun.* 67: 1860-1865).

5 По этой причине интоксикация для хозяйской клетки является существенной, хотя было показано, что экспрессируемые формы PA, содержащие мутации (Varughese 1999, выше) или делеции (Brossier 1999, выше) на участке домена 4 не являются токсичными. Кристаллическая структура PA, представляющая собой домен 4, и в частности, петлю этого домена, состоящая из 19 аминокислот (703-722), в большей степени не защищена, чем остальные три домена, которые плотно ассоциированы друг с другом (Petrosa 1997, выше). Данная структурная компоновка может превращать домен 4 в очень рельефный эпитоп для распознавания иммунными эффекторными клетками, и поэтому химерные белки, содержащие домен 4, должны вызывать наибольший иммунный ответ.

15 Кроме того, в настоящем исследовании проливается свет на роль PA в стимуляции защитного иммунного ответа, демонстрирующего, что защита от инфицирования сибирской язвой может быть, отнесена на счет отдельных доменов PA.

Далее настоящее изобретение описывается подробно в примерах, со ссылками на прилагаемые чертежи.

На фиг.1 представлены частоты кодонов, найденные у *E.coli* и *B.anthraxis*.

20 На фиг.2, в соответствии с настоящим изобретением, приведена последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует PA *B.anthraxis*, как опубликовано у Welkos с соавт. выше.

На фиг.3 приведены SEQ ID No 3-14, которые представляют собой последовательности аминокислот и ДНК, используемые для кодирования разных доменов или сочетаний доменов из PA, что детализировано ниже.

На фиг.4 приведены SEQ ID No 15-16, которые представляют собой, соответственно, последовательности аминокислот и ДНК домена 4 PA.

30 Фиг.5 представляет собой таблицу, показывающую концентрацию IgG против rPA у A/J-мышей, иммунизированных внутримышечно в 1-й и 28-й дни 10 мкг химерного белка, содержащего PA-фрагмент, через 37 дней после первой иммунизации; представленные результаты соответствуют средней \pm стандартная ошибка (sem) образцов, взятых у 5 мышей подопытной группы.

Пример 1

Исследование экспрессии у *E.coli*

35 Плазмиду pAG163::rPA, экспрессирующую rPA, модифицируют, заменяя Km^R-маркер исходным Tc^R-геном. Эту плазмиду трансформируют в экспрессирующую клетку-хозяина *E.coli* BLR (DE3), а затем оценивают уровень экспрессии и растворимость. Данный штамм является дефицитным по внутриклеточной протеазе La (продукт гена *lon*) и по протеазе наружной мембраны *OmpT*.

40 Однако проведенные исследования по экспрессии не показали какого-либо улучшения в накоплении растворимого белка у данного штамма в сравнении с хозяйскими штаммами K12 *lon*⁺ (т.е. накопление преодолевается чрезмерным протеолизом). Сделан вывод о том, что любой внутриклеточный протеолиз rPA не обусловлен действием La-протеазы.

Пример 2

45 Анализ ферментации

Осуществляли дополнительный анализ ферментации, который выполняли с использованием штамма K12 UT5600 (DE3) pAG163::rPA.

50 Установлено, что rPA в данной культуре распределяется между растворимой и нерастворимой фракциями (предположительно 350 мг/л для нерастворимого rPA, 650 мг/л для полноразмерного растворимого rPA). В используемых условиях (37°C, 1 mM IPTG для индукции) растворимый rPA во встряхиваемых культурах в колбах обнаружению не поддается, но, с учетом результатов, описанных выше в Примере 1, вызывает удивление наличие большого количества растворимого rPA. Как бы то ни было, представляется, что

регулирование ферментации, запуска и момента сбора клеток, выращенных в культуре, позволяет стабильно накапливать rPA в экспрессирующих штаммах K12 E.coli.

Пример 3

Образец rPA получают из материала, первоначально выделенного в виде нерастворимых внутриклеточных включений (внутриклеточные тельца) из ферментируемого штамма UT5600 (DE3) pAG163::rPA. Внутриклеточные включения дважды промывают с помощью 25 мМ Трис-HCl pH 8,0 и один раз - с помощью этого же буфера + 2М мочевины. Затем их сольбилизируют в буфере с +8М мочевиной, и дебрис осаждают. Мочевину удаляют путем разведения в 25 мМ Трис-HCl pH.8,0 и статически инкубируют в течение ночи при 4°C. Разбавленный образец наносят на колонку с Q-сефарозой, и белок элюируют NaCl-градиентом. Фракции, содержащие наиболее чистый rPA, объединяют, отбирают аликвоты и замораживают при -70°C. Тестирование данного образца с использованием 4-12% MES-SDS NuPAGE геля против известного стандарта свидетельствует о его высокой чистоте и низкой контаминации эндотоксином.

Пример 4

Дополнительная характеристика полученного продукта

N-концевое секвенирование полученного продукта показывает, что N-концевая последовательность состоит из

MEVKQENRLL (SEQ ID NO 2)

Это подтверждает, что данный продукт, как и предполагалось, находится слева по отношению к инициаторному метионину.

Обнаружили, что полученный материал реагирует в Вестерн-блоте; по данным MALDI-MS, данный образец обладает массой приблизительно 82700 (по сравнению с предполагаемой массой 82915). Разницу между большой молекулярной массой полученного материала и массой используемого стандарта (66 кДа) рассматривают как указание на то, что материал существенно не укорочен, но и не исключает микрогетерогенности анализируемого образца.

Пример 5

Тестирование отдельных доменов PA

Индивидуальные домены PA получают в виде рекомбинантных белков в E.coli в виде химерных белков с белком-носителем глутатион-s-трансферазой (GST) и с использованием экспрессионной системы Pharmacia pGEX-6P-3. Последовательности разных доменов и ДНК-последовательность, используемая для их кодирования, прилагаются в виде Фиг.3. Соответствующие аминокислотные и ДНК-последовательности даны ниже в Таблице 2.

Данные химерные белки используются для иммунизации A/J-мышей (Harlan Olac) путем внутримышечного введения 10 мкг соответствующего химерного белка, адсорбированного на 20% об/об алгидрогеле в общем объеме 100 мкл.

Животных дважды иммунизируют случайным образом, и развитие их защитного иммунитета определяет путем заражения спорами B. anthracis (STI-штамм) на уровне индикаторных доз. В нижеследующей таблице 2 приведены данные о животных, оставшихся в живых к 14 дню после заражения.

Таблица 2								
Степень заражения спорами/мышь								
Домены	Аминокислотная SEQ ID NO	ДНК SEQ ID NO	5x10 ⁴	9x10 ⁴	9x10 ⁵	1x10 ⁶	5x10 ⁶	
GST-1	3	4	4/4	3/5				

Домены	Аминокислотная SEQ ID NO	ДНК SEQ ID NO	5x10 ⁴	9x10 ⁴	9x10 ⁵	1x10 ⁶	5x10 ⁶
GST-1+2	5	6	4/4; 5/5	4/5; 5/5			
GST-1b+2	7	8	2/5	1/5			
GST-1b+2+3	9	10	2/5	3/5			
GST-1+2+3	11	12	Nd	4/5	3/5		
GST-1+2+3+4	13	14	Nd	5/5	5/5		
1+2+3+4	13	14	Nd	Nd		5/5	5/5

Представленные данные свидетельствуют о том, что сочетание всех 4 доменов PA, представленного ли в виде химерного белка с GST или без нее, оказывает защитное действие и при самом высоком уровне заражения. Удаление домена 4, когда остаются 1+2+3, приводит к сбою защиты при наивысшем протестированном уровне заражения, 9×10^5 . Домены 1+2 оказываются защитными в сочетании доменов 1+2+3 при уровне заражения 9×10^4 спор. Однако удаление домена 1a, когда остается слияние GST с доменами 1b+2, приводит к нарушению защиты при наивысших протестированных уровнях заражения (9×10^4), которая несколько улучшается при добавлении домена 3.

Полученные данные свидетельствуют о том, что защитный иммунитет, стимулированный PA, может быть связан с отдельными доменами (интактным доменом 1 и доменом 4) или с сочетаниями всех 4-х доменов, взятыми в измененном порядке.

Аминокислотная последовательность и ДНК-последовательность домена 4 представлены на Фиг.4, соответственно, в виде SEQ ID No 15 и 16.

Пример 6

Дополнительное тестирование доменов в качестве вакцин

ДНК из *B.anthraxis Sterne*, кодирующую домены PA, аминокислоты 1-259, 168-488, 1-488, 168-596, 1-596, 260-735, 489-735, 597-735 и 1-735 (соответственно, укороченные GST1, GST1b-2, GST1-2, GST1b-3, GST1-3, GST2-4, GST3-4, GST4 и GST1-4),

амплифицируют с помощью PCR и клонируют в *XhoI/BamHI*-сайты экспрессирующего вектора pGEX-6-P3 (Amersham-Pharmacia) правее от точки старта транскрипции и под *lac*-промотором. Белки, продуцируемые с использованием данной системы, экспрессируются в виде химерных (гибридных) белков с белком глутатион-S-трансфераза (GST) на N-конце. Затем рекомбинантную плазмидную ДНК, несущую вышеуказанную ДНК, кодирующую домены PA, трансформируют в *E.coli* BL21 для анализа экспрессируемого белка.

E.coli BL21, заякоренную плазмидами pGEX-6-P3, культивируют в L-среде, содержащей 50 мкг/мл ампициллина, 30 мкг/мл хлорамфеникола и 1% вес/объем глюкозы. Перед индуцированным с помощью 0.5 мМ IPTG культуры инкубируют в режиме встряхивания (170 об/мин.⁻¹) при 30°C и A_{600nm} 0.4. Далее культуры инкубируют в течение 4 часов, с последующим сбором клеток путем центрифугирования при 10000 об/мин, в течение 15 минут.

В результате начального экстрагирования укороченных химерных белков PA обнаружено, что они были получены в виде внутриклеточных телец. Осажденные клетки ресуспендируют в фосфатно-солевом буфере (PBS) и обрабатывают ультразвуком в течение 4x20 секунд на водяной бане с кусочками льда. Обработанную ультразвуком суспензию центрифугируют при 15000 об/мин, в течение 15 минут, и затем осадок клеток экстрагируют мочевиной путем их суспендирования в 8М мочевины и перемешивания при комнатной температуре в течение 1 часа. Эту суспензию центрифугируют в течение 15 минут при 15000 об/мин, и полученный супернатант диализуют против 100 мл Трис, pH 8,0, содержащем 400 мМ L-аргинина и 0,1 мМ ЭДТА перед диализом в PBS.

Успешная повторная упаковка укороченных химерных белков PA позволяет осуществить их выделение путем очистки на колонке по средству с глутатионовой Сефарозой CL-4B. Все экстракты (за исключением укороченного GST1b-2, аминокислотные остатки 168-487) наносят на 15 мл-овую колонку с глутатионовой CL-4B Сефарозой (Amersham-Pharmacia), предварительно уравновешенную PBS и инкубированную с покачиванием в течение ночи при 4°C. Эту колонку промывают с помощью PBS, и химерный белок элюируют 50 мМ Трис, pH 7,0, содержащем 150 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА и 20 мМ восстановленного глутатиона. Фракции, содержащие укороченные PA, идентифицируют путем анализа в SDS-PAGE, объединяют и диализуют против PBS. Концентрацию белка определяют с использованием BCA (Perbio).

Однако укороченный GST1b-2 невозможно элюировать с колонки по средству с глутатионсефарозой CL-4B при использовании восстановленного глутатиона, и поэтому его выделяют путем очистки с использованием ионообменной хроматографии. В данном

случае укороченный GST1b-2 перед загрузкой в колонку HiTrap Q (Amersham-Pharmacia), уравновешенную 20 мМ Трис рН 8,0, диализуют против этого же буфера. Химерный белок элюируют возрастающим градиентом NaCl 0-1 М в 20 мМ Трис рН 8,0. Фракции, содержащие указанный GST-белок, объединяют, концентрируют и загружают в гель-5 фильтрационную колонку HiLoad 26/60 Superdex 200 (Amersham-Pharmacia), предварительно уравновешенную PBS. Фракции, содержащие химерный белок, объединяют, и концентрацию данного белка определяют с помощью BCA (Perbio). Выход колеблется между 1 и 43 мг на литр культуры.

Молекулярные массы фрагментов и их распознавание антителами против PA 10 подтверждают с использованием SDS-PAGE и Вестерн-блоттинга. Анализ укороченных rPA с помощью SDS-PAGE и Вестерн-блоттинга обнаруживает белковые полосы ожидаемого размера. Некоторая деградация всех исследованных укороченных rPA обнаруживает их явное сходство с рекомбинантным PA, экспрессируемым *B.subtilis*. Укороченные rPA GST1, GST1b-2 и GST1-2, в отсутствие домена 3, оказываются особенно чувствительными к 15 деградации. Это аналогично тому, о чем сообщалось в отношении конструкций rPA, содержащих мутации в домене 3, которые невозможно выделить путем очистки из культуральных супернатантов *B.anthraxis* (Brossier 1999), что свидетельствует о том, что домен 3, вероятно, стабилизирует домены 1 и 2.

В данном исследовании используют самок совершенно здоровых A/J-мышей (Harlan UK), 20 поскольку они являются подходящей моделью для заражения сибирской язвой (Welkos 1986). К началу данного исследования мыши были половозрелыми в возрасте семи недель.

A/J-мышей иммунизируют в 1-й и 28-й дни данного исследования 10 мкг химерного белка, адсорбированного до 20% 1,3%-м об/об Alhydrogel (HCl Biosector, Denmark) в общем объеме 100 мкл PBS. Были также включены группы животных, иммунизированных 25 rPA из *B.subtilis* (Miller 1998) вместе с рекомбинантным контрольным белком GST, или химерными белками, кодирующими домены 1, 4 и 1-4, которые содержат удаляемую GST-метку. Иммунизирующие дозы вводят внутримышечно в участки на задних лапках. У мышей берут образцы крови через 37 дней после первой иммунизации на анализ сывороточных антител с помощью фермент-зависимого иммуносорбентного анализа (ELISA).

Планшеты для микротитрования (Immulon 2, Dynex Technologies) покрывают в течение 30 ночи при 4°C 5 мкг/мл rPA, экспрессируемого *B.subtilis* (Miller 1998), в PBS, за исключением двух рядов на планшете, которые покрывают 5 мкг/мл мышинных антител против Fab (Sigma, Poole, Dorset). Планшеты промывают PBS, содержащим 1% об/об Твина 20 (PBS-T) и блокируют 5% вес/об обезжиренным порошковым молоком в PBS (реагент для 35 анализа вестерн-блоттингом) в течение 2 часов при 37°C. В лунки, покрытые rPA, приливают сыворотку, разбавленную в два раза 1%-м реагентом для анализа вестерн-блоттингом, и анализируют в повторе со стандартным мышинным IgG (Sigma), добавляемым к анти-Fab-антителам, покрывающим лунки, и инкубируют в течение ночи при 4°C. После промывки во все лунки добавляют пероксидазу хрена, конъюгированную с антителами козы 40 против IgG мыши (Southern Biotechnology Associates Inc.), разбавленными 1:2000 в PBS, и инкубируют в течение 1 часа при 37°C. Планшеты вновь промывают перед добавлением субстрата 2,2'-Azinobis (3-этилбензтиазолинсульфоная кислота) (1,09 мМ ABTS, Sigma). Через 20 минут инкубации при комнатной температуре измеряют поглощение в 45 лунках при 414 нм (Titertek Multiscan, ICN Flow). Стандартные кривые рассчитывают с использованием программного обеспечения TiterSoft version 3.1c. Титры были представлены в виде мкг IgG на мл сыворотки с вычислением групповых средних \pm стандартная ошибка для данной средней (sem). Полученные результаты представлены на Фиг.5.

50 Все полученные укороченные rPA оказались иммуногенными и повышали у A/J-мышей средние значения концентраций IgG антисыворотки к rPA в диапазоне от 6 мкг на мл в группе, иммунизированной укороченным GST1b-2, до 1488 мкг на мл в группе, иммунизированной укороченным GST 1-4 (Фиг.5). У контрольных мышей, иммунизированных GST, антитела против rPA не обнаруживались.

Мышей заражали спорами *B. anthracis* STI на 70-й день режима иммунизации. Из штамма выделяли достаточное количество STI-спор, промывали дистиллированной водой и ресуспендировали в PBS до концентрации 1×10^7 и 1×10^6 спор на мл. Мышей заражали

5
внутрибрюшинно 0,1 мл-овыми объемами, соответственно, содержащими 1×10^6 и 1×10^5 спор на мыш, и контролировали их в течение 14 дней после заражения для установления их защитного статуса. Гуманное отношение к животным строго соблюдалось в том отношении, что выбраковывались те животные, у которых наблюдались клинические симптомы, сочетание которых указывает на наличие у него смертельной инфекции. Численность иммунизированных мышей, которые выживали к 14-му дню после заражения, приведена в Таблице 3.

Таблица 3		
Домен	Уровни заражения MLD выжившие/количество зараженных (%)	
	10 ² MLD	10 ³ MLD
GST 1	3/5 (60)	1/5 (20)
GST 1b-2	1/5 (20)	Nd
GST 1-2	5/5 (100)	3/5 (60)
GST 1b-3	3/5 (60)	Nd
GST 1-3	4/5 (80)	Nd
GST 1-4	Nd	5/5 (100)
GST 2-4	Nd	5/5 (100)
GST 3-4	Nd	5/5 (100)
GST 4	5/5 (100)	5/5 (100)
GST 1 + GST 4	Nd	5/5 (100)
Отщепляемый 1	1/5 (20)	2/5
Отщепляемый 4	5/5 (100)	5/5
Отщепляемый 1-4	Nd	5/5
rPA	Nd	4/4 (100)
контроль	0/5 (0)	0/5 (0)
MLD = приблизительно 1×10^3 STI-спор Nd = не определялось		

30 Группы, зараженные 10^3 MLD STI-спор, были полностью все защищены, за исключением групп, иммунизированных GST1, GST1-2 и отщепленным доменом 1, где отмечен некоторый сбой в защите, и в контрольной группе, иммунизированной лишь GST, в которой все оказались восприимчивы к инфекции со средним временем гибели (MTTD) $2,4 \pm 0,2$ дня. При самом низком уровне заражения 10^2 MLD GST1-2, GST4 и отщепленным доменом 4 - все иммунизированные группы были полностью защищены, но в других группах отмечен некоторый сбой в защите. Мыши, которые погибли в этих группах, характеризовались MTTD $4,5 \pm 0,2$ дня, что несущественно отличается от контрольной группы, иммунизированной GST, в которой все погибли с показателем MTTD $4 \pm 0,4$ дня.

40 Формула изобретения

1. Иммуногенный полипептид, вызывающий иммунный ответ, который является защитным ответом против *Bacillus anthracis*, где указанный полипептид содержит от одного до трех доменов полноразмерного Защитного Антигена (РА) *B. anthracis* или их варианты, являющихся результатом делеций, и/или замен в аминокислотной последовательности, не приводящих к потере иммуногенности, и где, по меньшей мере, один из указанных доменов является доменом 1, или доменом 4 из РА, или его вариантом.

2. Иммуногенный полипептид по п.1, который включает в себя домен 4 РА из *B. anthracis*.

3. Иммуногенный полипептид по п.1, который включает в себя домен 1, слитый с доменом 2 РА-последовательности.

4. Иммуногенный полипептид по п.1, который включает в себя домен 1, слитый с доменом 2 и доменом 3 из РА-последовательности.

5. Иммуногенный полипептид, который включает в себя комбинацию домена 1 или его защитного участка 1а и домена 4 полноразмерного Защитного Антигена (РА) из *B.*

anthracis или их варианты, являющиеся результатом делеций, и/или замен в аминокислотной последовательности, не приводящих к потере иммуногенности.

6. Иммуногенный полипептид по п.5, который включает в себя последовательность домена 1 и домена 4 из PA дикого типа.

5 7. Иммуногенный полипептид, вызывающий иммунный ответ, который является защитным ответом против *Bacillus anthracis*, где указанный полипептид состоит из полипептида по п. 1, слитого с GST.

8. Иммуногенный полипептид по пп.1-6, используемый в качестве активного ингредиента для получения лекарственного средства для профилактики или лечения инфекции *B. anthracis*.

9. Иммуногенный полипептид по п.7, используемый в качестве активного ингредиента для получения лекарственного средства для профилактики или лечения инфекции *B. anthracis*.

10. Нуклеиновая кислота, кодирующая иммуногенный полипептид, вызывающий 15 иммунный ответ, который является защитным ответом против *Bacillus anthracis*, и характеризующаяся последовательностью нуклеиновой кислоты, которая, по существу, соответствует аминокислотной последовательности иммуногенного полипептида по п. 1 или 3.

11. Вектор для экспрессии в бактериальных клетках, содержащий нуклеиновую кислоту 20 по п.10, оперативно связанную с регуляторной областью.

12. Способ получения иммуногенного полипептида по любому из пп. 1-6, включающий в себя трансформирование *E.coli*-хозяина нуклеиновой кислотой по п. 10, культивирование трансформированного хозяина и получение указанного иммуногенного полипептида.

13. Способ по п.12, где полипептид является доменом 1 и/или доменом 4 защитного 25 антигена PA из *Bacillus anthracis*.

14. Способ по п.12 или 13, где нуклеиновая кислота оптимизирована к условиям экспрессии в указанных клетках так, что процентная доля остатков гуанидина и цитозина в указанной нуклеиновой кислоте превышает 35%.

15. Способ по п.14, где процентная доля остатков гуанидина и цитозина в указанной 30 нуклеиновой кислоте превышает 45%.

16. Способ по п.15, где процентная доля остатков гуанидина и цитозина в указанной нуклеиновой кислоте составляет от 50-52%.

17. Вектор, трансформирующий *E.coli*, включающий в себя нуклеиновую кислоту по п. 10.

18. Вектор, трансформирующий *E.coli* по п.17, где нуклеиновая кислота оптимизирована 35 к условиям экспрессии в указанных клетках так, что процентная доля остатков гуанидина и цитозина в указанной нуклеиновой кислоте превышает 35%.

19. Вектор, трансформирующий *E.coli*, по п.18, где процентная доля остатков гуанидина и цитозина в указанной нуклеиновой кислоте превышает 45%.

20. Вектор, трансформирующий *E.coli*, по п.19, где процентная доля остатков 40 гуанидина и цитозина в указанной нуклеиновой кислоте составляет от 50-52%.

21. Способ предупреждения инфекции, вызванной *B. anthracis*, включающий в себя введение млекопитающему достаточного количества иммуногенного полипептида по 45 любому из пп.1-6.

22. Вакцина для предупреждения инфекции, вызываемой *B. anthracis*, содержащая эффективное количество полипептида по п. 1 и подходящий носитель.

***Escherichia coli* [gbbet]: 14457 CDS's (4541861 кодонов)**

Участки: [триплет] [частота: на тысячу] ([количество])

UUU 22.0 (100128)	UCU 9.3 (42367)	UAU 16.7 (75774)	UGU 5.2 (23461)
UUC 16.5 (74885)	UCC 8.9 (40365)	UAC 12.3 (55847)	UGC 6.3 (28747)
UUA 13.8 (62823)	UCA 7.9 (35837)	UAA 2.0 (9006)	UGA 1.0 (4428)
UUG 13.3 (60322)	UCG 8.7 (39546)	UAG 0.3 (1172)	UGG 14.5 (65630)
CUU 11.3 (51442)	CCU 7.2 (32678)	CAU 12.7 (57585)	CGU 20.7 (93997)
CUC 10.6 (48147)	CCC 5.4 (24383)	CAC 9.6 (43743)	CGC 21.1 (96053)
CUA 4.0 (18067)	CCA 8.5 (38663)	CAA 14.8 (67129)	CGA 3.7 (16607)
CUG 50.9 (231373)	CCG 22.3 (101467)	CAG 28.8 (130898)	CGG 5.7 (25751)
AUU 29.9 (135873)	ACU 9.5 (43256)	AAU 18.7 (84846)	AGU 9.1 (41544)
AUC 24.6 (111878)	ACC 22.7 (103121)	AAC 21.6 (98018)	AGC 15.6 (70867)
AUA 5.3 (24233)	ACA 7.9 (35995)	AAA 34.4 (156169)	AGA 2.7 (12345)
AUG 27.2 (123604)	ACG 14.0 (63696)	AAG 11.4 (51685)	AGG 1.6 (7423)
GUU 19.1 (86572)	GCU 16.2 (73677)	GAU 32.3 (146794)	GGU 25.1 (114185)
GUC 14.8 (67356)	GCC 25.0 (113412)	GAC 19.3 (87759)	GGC 28.6 (130043)
GUA 11.2 (51020)	GCA 20.6 (93390)	GAA 39.5 (179460)	GGA 8.6 (39036)
GUG 25.5 (115687)	GCG 32.2 (146264)	GAG 18.5 (83804)	GGG 11.1 (50527)

кодирование GC 51.37%^{1-я буква} GC 58.50%^{2-я буква} GC 40.70%^{3-я буква} GC 54.90%

***Bacillus anthracis* [gbbet]: 180 CDS's (52031 кодонов)**

Участки: [триплет] [частота: на тысячу] ([количество])

UUU 33.5 (1745)	UCU 17.3 (902)	UAU 34.4 (1792)	UGU 6.1 (319)
UUC 10.2 (530)	UCC 5.3 (275)	UAC 9.4 (490)	UGC 2.1 (107)
UUA 44.2 (2301)	UCA 14.0 (730)	UAA 2.3 (119)	UGA 0.5 (24)
UUG 11.3 (589)	UCG 3.6 (188)	UAG 0.7 (37)	UGG 9.8 (511)
CUU 14.7 (763)	CCU 10.1 (525)	CAU 16.8 (873)	CGU 10.9 (567)
CUC 3.7 (195)	CCC 2.7 (141)	CAC 4.6 (239)	CGC 2.6 (137)
CUA 13.2 (686)	CCA 14.9 (773)	CAA 33.7 (1752)	CGA 6.8 (353)
CUG 4.7 (242)	CCG 4.6 (237)	CAG 10.4 (542)	CGG 1.8 (95)
AUU 44.6 (2322)	ACU 14.6 (761)	AAU 44.6 (2321)	AGU 16.5 (861)
AUC 11.8 (616)	ACC 5.2 (269)	AAC 13.7 (711)	AGC 5.1 (266)
AUA 24.9 (1295)	ACA 25.9 (1350)	AAA 69.5 (3614)	AGA 13.8 (720)
AUG 23.8 (1240)	ACG 8.1 (419)	AAG 23.5 (1223)	AGG 4.3 (226)
GUU 19.9 (1036)	GCU 17.9 (930)	GAU 39.7 (2068)	GGU 17.3 (900)
GUC 5.2 (268)	GCC 4.7 (244)	GAC 8.8 (456)	GGC 5.4 (279)
GUA 26.8 (1395)	GCA 22.6 (1178)	GAA 55.7 (2897)	GGA 20.2 (1049)
GUG 9.7 (507)	GCG 7.1 (368)	GAG 19.3 (1003)	GGG 8.9 (461)

кодировани GC 33.59%^{1-я буква} GC 44.51%^{2-я буква} GC 31.07%^{3-я буква} GC 25.20%

ФИГ. 1

1 AAGCTTCATA TGGAAGTAAA GCAAGAGAAC CGTCTGCTGA ACGAATCTGA ATCCAGCTCT
 61 CAGGGCCTGC TTGGTTACTA TTTCTCTGAC CTGAACTTCC AAGCACCGAT GGTTGTAACC
 121 AGCTCTACCA CTGGCGATCT GTCCATCCCG TCTAGTGAAC TTGAGAACAT TCCAAGCGAG
 181 AACCAGTATT TCCAGTCTGC AATCTGGTCC GGTMTTATCA AAGTCAAGAA ATCTGATGAA
 241 TACACGTTTG CCACCTCTGC TGATAACCAC GTAACCATGT GGGTTGACGA TCAGGAAGTG
 301 ATCAACAAG CATCCAACCTC CAACAAAATF CGTCTGGAAA AAGGCCGTCT GTATCAGATC
 361 AAGATTCAGT ACCAACGCGA GAACCCGACT GAAAAAGGCC TGGACTTTAA ACTGTATTGG
 421 ACTGATTCTC AGAACAAAGAA AGAAGTGATC AGCTCTGACA ATCTGCAACT GCCGGAAATG
 481 AACCGAAAA GCTCCAACCTC TCGTAAGAAA CGTTCACCA CCGCTGGCCC GACCGTACCA
 541 GATCGCGACA ACGATGGTAT TCCGGACTCT CTGGAAGTGT AAGGCTACAC GGTGATGTA
 601 AAGAACAAC GTACCTTCCT TAGTCCGTGG ATCTCCAATA TTCACGAGAA GAAAGGTCTG
 661 ACCAAATACA AATCCAGTCC GGAAAAATGG TCCACTGCAT CTGATCCGTA CTCTGACTTT
 721 GAGAAAGTGA CCGGTGCTAT CGACAAAGAAC GTCTCTCCGG AAGCACGCCA TCCACTGGTT
 781 GCTGCGTATC CGATCGTACA TGTTGACATG GAAAACATCA TTTTGTCCAA GAACGAAGAC
 841 CAGTCCACTC AGAACACTGA CTCTGAAACT CGTACCATCT CCAAGAACAC CTCCACGTCT
 901 CGTACTCACA CCAGTGAAGT ACATGGTAAC GCTGAAGTAC ACGCCTCTTT CTTTGACATC
 961 GCGCGCTCTG TTAGCGCTGG CTTCTCCAAC TCTAATCTT CTACTGTTGC CATTGATCAC
 1021 TCTCTGAGTC TGGCTGGCGA ACGTACCTGG GCAGAGACCA TGGGTCTTAA CACTGCTGAT
 1081 ACCGCGCGTC TGAATGCTAA CATTGCTTAC GTCAACACTG GTACGGCACC GATCTACAAC
 1141 GTACTGCCAA CCACCAGCCT GGTTCCTGGGT AAGAACCAGA CTCTTGGCAG CATCAAAGCC
 1201 AAAGAGAACC AACTGTCTCA GATTCTGGCA CCGAATAACT ACTATCCTTC CAAGAACCTG
 1261 GCTCCGATCG CACTGAACGC ACAGGATGAC TTCTCTTCCA CTCCGATCAC CATGAACTAC
 1321 AACCAGTTC TGGAACTTGA GAAGACCAA CAGCTGCCTC TTGACACTGA CCAAGTGTAC
 1381 GGTAACATCG CGACCTACAA CTTTGAGAAC GGTCCGCTCC GCGTTGACAC AGGCTCTAAT
 1441 TGGTCTGAAG TACTGCCTCA GATTCAAGAA ACCACCCTC GTATCATCTT CAACGGTAAA
 1501 GACCTGAACC TGGTTGAACG TCGTATTGCT GCTGTGAACC CGTCTGATCC ATTAGAGACC
 1561 ACCAAACCGG ATATGACTCT GAAAGAAGCC CTGAAGATCG CTTTTGGCTT CAACGAGCCG
 1621 AACGGTAATC TTCAGTACCA AGGTAAAGAC ATCACTGAAT TTGACTTCAA CTTTGATCAG
 1681 CAGACCTCTC AGAATATCAA GAACCAACTG GCTGAGCTGA ACGCGACCAA TATCTATACG
 1741 GTACTCGACA AGATCAAACCT GAACCGGAAA ATGAACATTC TGATTGCGGA CAAACGTTTC
 1801 CACTACGATC GTAATAACAT CGCTGTTGGC GCTGATGAAT CTGTTGTGAA AGAAGCGCAT
 1861 CGCGAAGTCA TCAACTCCAG CACCGAAGGC CTGCTTCTGA ACATCGACAA AGACATTCGT
 1921 AAGATCCTGT CTGGTTACAT TGTGAGATC GAAGACACCG AAGGCCTGAA AGAAGTGATC
 1981 AATGATCGTT ACGACATGCT GAACATCAGC TCTCTGCGTC AAGATGGTAA GACGTTCAAT
 2041 GACTTCAAGA AATACAACGA CAAACTTCCG CTGTATATCT СТААТССГАА СТАСАААГТГ
 2101 AACGTTTACG CTGTTACCAA AGAGAACACC ATCATCAATC CATCTGAGAA CCGCGATACC
 2161 TCTACCAACG GTATCAAGAA GATTCTGATC TTCTCCAAGA AAGGTTACGA GATCGGTTAA
 2221 TAGGATCC

(SEQ ID No 1)

ФИГ. 2

1 EVKQENRLLN ESESSQGLL GYYFSDLNFO APMVVTSSST GDLSIPSSSEL ENIPSENQYF
 61 QSAIWSGFIK VKKSDEYTFA TSADNHVTMW VDDQEVINKA SNSNKIRLEK GRLYQIKIQY
 121 QRENPTKGL DFKLYWTD SQ NKKEVISSDN LQPELKQKS SNSRKKRSTS AGPTVPRDN
 181 DGIPDSLEVE GYTV DVKNR TFLSPWISNI HEKKGLTKYK SSPEKWSTAS DPYSDFEKT
 241 GRIDKNVSPE ARHPLVAA

(Seq ID No 3)

1 gaagttaaac aggagaaccg gttattaaat gaatcagaat caagttccca ggggttacta
 61 ggatactatt ttagtgattt gaattttcaa gcacccatgg tggttacctc ttctactaca
 121 ggggatttat ctattcctag ttctgagtta gaaaatattc catcggaaaa ccaatatttt
 181 caatctgcta tttggtcagg atttatcaaa gttaagaaga gtgatgaata tacatttgc
 241 acttccgctg ataatcatgt aacaatgtgg gtagatgacc aagaagtgat taataaagct
 301 tctaattcta acaaaatcag attagaaaaa ggaagattat atcaataaaa aattcaatat
 361 caacgagaaa atcctactga aaaaggattg gatttcaagt tgtactggac cgattctcaa
 421 aataaaaaag aagtgatttc tagtgataac ttacaattgc cagaattaa acaaaaatct
 481 tcgaactcaa gaaaaagcg aagtacaagt gctggacctc cggttccaga ccgtgacaat
 541 gatggaatcc ctgattcatt agaggtagaa ggatatacgg ttgatgtcaa aaataaaaga
 601 acttttcttt caccatggat ttctaattt catgaaaaga aaggattaac caaatataaa
 661 tcatctcctg aaaaatggag cacggcttct gatccgtaca gtgatttcga aaagttaca
 721 ggacggattg ataagaatgt atcaccagag gcaagacacc cccttggtggc agct

(Seq ID No 4)

1 EVKQENRLLN ESESSQGLL GYYFSDLNFO APMVVTSSST GDLSIPSSSEL ENIPSENQYF
 61 QSAIWSGFIK VKKSDEYTFA TSADNHVTMW VDDQEVINKA SNSNKIRLEK GRLYQIKIQY
 121 QRENPTKGL DFKLYWTD SQ NKKEVISSDN LQPELKQKS SNSRKKRSTS AGPTVPRDN
 181 DGIPDSLEVE GYTV DVKNR TFLSPWISNI HEKKGLTKYK SSPEKWSTAS DPYSDFEKT
 241 GRIDKNVSPE ARHPLVAAYP IVHVDMENII LSKNEDQSTQ NTDSETRTIS KNTSTSRHT
 301 SEVHGNAEVH ASFFDIGGSV SAGFSNSNSS TVAIDHLSL AGERTWAETM GLNTADTARL
 361 NANIRYVNTG TAPIYNVLP TSLVLGKNQT LATIKAKENQ LSQILAPNNY YPSKNLAPIA
 421 LNAQDDFSST PITMNYNQFL ELEKTKQLRL DTDQVYGNIA TYNFENGRVR VDTGSNWSEV
 481 LPQIQET

(SEQ ID No 5)

ФИГ. 3

1 gaagttaaac aggagaaccg gttattaaat gaatcagaat caagttccca ggggttacta
 61 ggatactatt ttagtgattt gaattttcaa gcacccatgg tggttacttc ttctactaca
 121 ggggatttat ctattcctag ttctgagtta gaaaatattc catcggaaaa ccaatatttt
 181 caatctgcta tttggtcagg atttatcaaa gttaagaaga gtgatgaata tacatttgcg
 241 acttccgctg ataatcatgt aacaatgtgg gtagatgacc aagaagtgat taataaagct
 301 tctaattcta acaaaatcag attagaaaaa ggaagattat atcaataaa aattcaatat
 361 caacgagaaa atcctactga aaaaggattg gatttcaagt tgtactggac cgattctcaa
 421 aataaaaaag aagtgatttc tagtgataac ttacaactgc cagaattaaa acaaaaatct
 481 tcgaaactca gaaaaaagcg aagtacaagt gctggacctc cggttccaga ccgtgacaat
 541 gatggaatcc ctgattcatt agaggtagaa ggatatacgg ttgatgtcaa aaataaaaga
 601 acttttcttt caccatggat ttctaattt catgaaaaga aaggattaac caaatataaa
 661 tcatctcctg aaaaatggag cacggcttct gatccgtaca gtgatttcga aaaggttaca
 721 ggacggattg ataagaatgt atcaccagag gcaagacacc cccttgtggc agcttatccg
 781 attgtacatg tagatatgga gaatattatt ctctcaaaaa atgaggatca atccacacag
 841 aatactgata gtgaaacgag aacaataagt aaaaataactt ctacaagtag gacacatact
 901 agtgaagtac atggaaatgc agaagtgcac gcgctcgttct ttgatattgg tgggagtgta
 961 tctgcaggat ttagtaattc gaattcaagt acggctcgsaa ttgatcattc actatctcta
 1021 gcaggggaaa gaacttgggc tgaacaatg ggtttaaata ccgctgatac agcaagatta
 1081 aatgccaata ttagatatgt aaatactggg acggctccaa tctacaacgt gttaccaacg
 1141 acttctgtag tgttaggaaa aaatcaaaaca ctgcgcaaa ttaaagctaa ggaaaaccaa
 1201 ttaagtcaaa tacttgcacc taataattat tctccttcta aaaacttggc gccaatcgca
 1261 ttaaatgcac aagacgattt cagttctact ccaattacaa tgaattacaa tcaatttctt
 1321 gagttagaaa aaacgaaaca attagatta gatacggatc aagtatatgg gaatatagca
 1381 acatacaatt ttgaaaatgg aagagtgagg gtggatacag gctcgaactg gagtgaagtg
 1441 ttaccgcaaa ttcaagaaac a

(SEQ ID No 6)

1 SAGPTVPDRD NDGIPDSLEV EGYTVDVRNK RTFLSPWISN IHEKKGILTKY KSSPEKWSTA
 61 SDPYSDFEKV TGRIDKNVSP EARHPLVAAY PIVHVDMENI ILSKNEDQST QNTDSETRTI
 121 SKNTSTSRTH TSEVHGNAEV HASFFDIGGS VSAGFSNSNS STVAIDHSLS LAGERTWAET
 181 MGLNTADTAR LNANIRYVNT GTAPIYNVLP TTSVLGKNQ TLATIKAKEN QLSQILAPNN
 241 YYPKSNLAPI ALNAQDDFSS TPITMNYNQF LELEKTKQLR LDTDQVYIGNI ATYNFENGRV
 301 RVDTGSNWSE VLPQIQET

(SEQ ID No 7)

ФИГ. 3 (продолжение)

```

1 agtgctggac ctacggttcc agaccgtgac aatgatggaa tccctgattc attagaggta
61 gaaggatata cggttgatgt caaaaataaa agaacttttc tttcaccatg gatttctaata
121 attcatgaaa agaaaggatt aaccaaatat aatcatctc ctgaaaaatg gagcacggct
181 tctgatccgt acagtgattt cgaaaagggtt acaggacgga ttgataagaa tgtatcacca
241 gaggcaagac accccttgt ggcagcttat ccgattgtac atgtagatat ggagaatatt
301 attctctcaa aaaatgagga tcaatccaca cagaatactg atagtgaaac gagaacaata
361 agtaaaaata cttctacaag taggacacat actagtgaag tacatggaaa tgcagaagtg
421 catgctgctg tctttgatat tgggtggagt gtatctgcag gatttagtaa ttcgaattca
481 agtacggtcg caattgatca ttcactatct ctagcagggg aaagaacttg ggctgaaaca
541 atgggtttaa ataccgctga tacagcaaga ttaaagcca atattagata tgtaaatact
601 gggacggctc caatctacaa cgtgttacca acgacttctg tagtgtagg aaaaaatcaa
661 aactcgcga caattaaagc taaggaaaac caattaagtc aaatacttgc acctaataat
721 tattatcctt ctaaaaactt ggcgccaatc gcattaaatg cacaagacga tttcagttct
781 actccaatta caatgaatta caatcaattt cttgagtag aaaaaacgaa acaattaaga
841 ttagatacgg atcaagtata tgggaatata gcaacataca attttgaaaa tggaagagtg
901 aggggtggata caggctcgaa ctggagtgaa gtgttaccgc aaattcaaga aaca

```

(SEQ ID No 8)

```

1 SAGPTVPDRD NDGIPDSLEV EGYTVDVKNK RTFLSPWISN IHEKKGLTKY KSSPEKWSTA
61 SDPYSDFEKV TGRIDKNVSP EARHELVAAY PIVHVDMENI ILSKNEQST QNTDSETRTI
121 SKNTSTSRTH TSEVHGNAEV HASFFDIGGS VSAGFSNSNS STVAIDHSLS LAGERTWAET
181 MGLNTADTAR LNANIRYVNT GTAPIYNVLP TTSLVLGKNQ TLATIKAKEN QLSQILAPNN
241 YPSKLNAPI ALNAQDDFSS TPITMNYNQF LELEKTKQLR LDTDQVYGN I ATYNFENGRV
301 RVDTGSNWSE VLPQIQETTA RIIFNGKDLN LVERRIAAVN PSDPLETKP DMTLKEALKI
361 AFGFNEPNGN LOYQGKDITE FDFNFDOOTS QNIKNQLAEL NATNIYTVLD KIKLNAMNI
421 LIRDKR

```

(SEQ ID No 9)

ФИГ. 3 (продолжение)

```

1 agtgctggac ctacggttcc agaccgtgac aatgatggaa tccctgattc attagaggta
61 gaaggatata cggttgatgt caaaaataaa agaactttc tttcaccatg gattttcta
121 attcatgaaa agaaaggatt aaccaaatat aaatcatctc ctgaaaaatg gagcacggct
181 tctgatccgt acagtgattt cgaaaagggt acaggacgga ttgataagaa tgtatcacca
241 gaggcaagac acccccttgt ggcagcttat ccgattgtac atgtagatat ggagaatatt
301 attctctcaa aaaatgagga tcaatccaca cagaatactg atagtgaac gagaacaata
361 agtaaaaaata cttctacaag taggacacat actagtgaag tacatggaaa tgcagaagtg
421 catgcgtcgt tctttgatat tgggtggagt gtatctgcag gatttagtaa ttcgaattca
481 agtacggtcg caattgatca ttcactatct cttagcagggg aaagaacttg ggctgaaaca
541 atgggtttaa ataccgctga tacagcaaga ttaaagcca atattagata tgtaaatact
601 gggacggctc caatctacaa cgtgttacca acgacttcgt tagtgttagg aaaaaatcaa
661 aactcgcga caattaaagc taaggaaaac caattaaagc aaatacttgc acctaataat
721 tattatcctt ctaaaaactt ggcgccaatc gcattaaatg cacaagacga tttcagttct
781 actccaatta caatgaatta caatcaattt cttgagttag aaaaaacgaa acaattaaga
841 ttagatacgg atcaagtata tgggaatata gcaacataca attttgaaaa tgggaagagtg
901 agggtgata caggctcgaa ctggagtgaa gtgttaccgc aaattcaaga aacaactgca
961 cgtatcattt ttaatggaaa agatttaaat ctggtagaaa ggcggatagc ggcggttaat
1021 ctagtgatc cattagaaac gactaaaccg gatatgacat taaaagaagc ccttaaaata
1081 gcatttggat ttaacgaacc gaatggaaac ttacaatatc aagggaaga cataaccgaa
1141 tttgatttta atttcgatca acaaacatct caaaatatca agaatcagtt agcggaaata
1201 aacgcaacta acatatatac tgtattagat aaaatcaaat taaatgcaaa aatgaatatt
1261 ttaataagag ataaacgt

```

(SEQ ID No 10)

```

1 EVKQENRLLN ESESSSQGLL GYFSDLNFQ APMVVSSTT GDLSIPSEL ENIPSENOYF
61 QSAIWSGFIK VKKSDEYTF A TSADNHVTMW VDDQEVINKA SNSNKIRLEK GRLYQIKIQY
121 QRENPTKGL DFKLYWTD SQ NKKEVISSDN LQLPELKQKS SNSRKKRSTS AGPTVPRDN
181 DGIPDSLEVE GYTVDVKNKR TFLSPWISNI HEKKGLTKYK SSPEKWSTAS DPYDFEKT
241 GRIDKNVSPE ARHPLVAAYP IVHVDMENII LSKNEDQSTQ NTDSETRTIS KNTSTSRHT
301 SEVHGNAEVH ASFFDIGGSV SAGFSNSNSS TVAIDHSLSL AGERTWAETM GLNTADTARL
361 NANIRYVNTG TAPIYVLP TSLVLGKNQT LATIKAKENQ LSQILAPNNY YPSKNLAPIA
421 LNAQDDFSST PITMNYNQFL ELEKTKQLRL DTDQVYGNIA TYNFENGRVR VDTGSNWSEV
481 LPQIQETAR IIFNGKDLNL VERRIAAVNP SDPLETTKPD MTLKEALKIA FGFNEPNGNL
541 QYQKDI TE F DFNFDQOTSQ NIKNQLAELN AFNIYTVL DK IKLNAKMNIL IRDKR

```

(SEQ ID No 11)

ФИГ. 3 (продолжение)

```

1 gaagttaaac aggagaaccg gttattaat gaatcagaat caagttccca ggggttacta
61 ggatactatt ttagtgattt gaattttcaa gcacccatgg tggttacctc ttctactaca
121 ggggatttat ctattcctag ttctgagtta gaaaatattc catcggaaaa ccaatatttt
181 caatctgcta tttggtcagg atttatcaaa gttaagaaga gtgatgaata tacatttgct
241 acttccgctg ataatcatgt aacaatgtgg gtagatgacc aagaagtgat taataaagct
301 tctaattcta acaaaatcag attagaaaaa ggaagattat atcaataaa aattcaatat
361 caacgagaaa atcctactga aaaaggattg gatttcaagt tgtactggac cgattctcaa
421 aataaaaaag aagtgatttc tagtgataac ttacaattgc cagaattaaa acaaaaatct
481 tcgaactcaa gaaaaaagcg aagtacaagt gctggacctc cggttccaga ccgtgacaat
541 gatggaatcc ctgattcatt agaggtagaa ggatatacgg ttgatgtcaa aaataaaga
601 acttttcttt caccatggat ttctaattt catgaaaaga aaggattaac caaatataaa
661 tcatctcctg aaaaatggag cacggcttct gatccgtaca gtgatttcga aaaggttaca
721 ggacggattg ataagaatgt atcaccagag gcaagacacc cccttggtggc agcttatccg
781 attgtacatg tagatatgga gaatattatt ctctcaaaaa atgaggatca atccacacag
841 aatactgata gtgaaacgag aacaataagt aaaaatactt ctacaagtag gacacatact
901 agtgaagtac atggaaatgc agaagtgcac gcgtcgttct ttgatattgg tgggagtgt
961 tctgcaggat ttagtaattc gaattcaagt acggtcgcaa ttgatcattc actatctcta
1021 gcaggggaaa gaacttgggc tgaacaatg ggtttaaata ccgctgatac agcaagatta
1081 aatgccaata ttagatatgt aaatactggg acggtccaa tctacaacgt gttaccaacg
1141 acttcgttag tgttaggaaa aaatcaaca ctcgcgaca ttaaagctaa gaaaaccaa
1201 ttaagtcaaa tacttgcacc taataattat tctcctcta aaaacttggc gccaatcgca
1261 ttaaattgac aagacgattt cagttctact ccaattaca tgaattaca tcaatttctt
1321 gacttagaaa aaacgaaaca attaagatta gatacggatc aagtatatgg gaatatagca
1381 acatacaatt ttgaaaatgg aagagtgagg gtggatacag gctcgaactg gagtgaagtg
1441 ttaccgcaa ttcaagaaac aactgcacgt atcattttta atggaaaaga ttaaactctg
1501 gtagaaaggc ggatagcggc ggттаатссt агtгаtссat tagaaacgac taaaccggat
1561 atgacattaa aagaagccct taaaatagca tttggattta acgaaccgaa tggaaactta
1621 caatatcaag ggaaagacat aaccgaattt gattttaatt tcgatcaaca aacatctcaa
1681 aatatcaaga atcagttagc ggaattaaac gcaactaaca tataactgtt attagataaa
1741 atcaaattaa atgcaaaaat gaatatttta ataagagata aacgt

```

(SEQ ID No 12)

```

1 EVKQENRLLN ESESSQGLL GYYFSDLNFQ APMVVTSTTT GDLSIPSSSEL ENIPSENQYF
61 QSAIWSGFIK VKKSDEYTFE TSADNHEVTMW VDDQEVINKA SNSNKIRLEK GRLYQIKIQY
121 QRENPTKGL DFKLYWTD SQ NKKEVISSDN LQLPELKQKS SNSRKKRST S AGPTVPRDN
181 DGIPDSLEVE GYTVDVKNKR TFLSPWISNI HEKKGLTKYK SSPEKWSTAS DPYSDFEKVT
241 GRIDKNVSPE ARHPLVAAYP IVHVDMENII LSKNEDQSTQ NTDSQTRTIS KNTSTSRHT
301 SEVHGNAEVH ASFFDIGGSV SAGFSNSNSS TVAIDHLSL AGERTWAETM GLNTADTARL
361 NANIRYVNTG TAPIYNVLP TSLVLGKNQT LATIKAKENQ LSQILAPNNY YPSKNLAPIA
421 LNAQDDFSST PITMNYNQFL ELEKTRQLRL DTDQVYGNIA TYNFENGRVR VDTGSNWSEV
481 LPQIQETTAR IIFNGKDLNL VERRIAAVNP SDPLETTKPD MTLKEALKIA FGFNEPNGNL
541 QYQK DITEF DFNFDQQTSQ NIKNQLAELN ATNIYTVLDK IKLNAMNIL IRDKRFHYDR
601 NNI AVGADES VVKEAHREVI NSSTEGLLN IDKDIRKILS GYIVEIEDTE GLKEVINDRY
661 DMLN ISSLRQ DGKTFIDFKK YNDKLP LYSIS NPNYKVN VYA VTKENTIINP SENGDTSTNG
721 IKKILIFS KK GYEIG

```

(SEQ ID No 13)

ФИГ. 3 (продолжение)

```

1 gaagttaaac aggagaaccg gttattaaat gaatcagaat caagttccca ggggttacta
61 ggatactatt ttagtgattt gaattttcaa gcacccatgg tggttacctc ttctactaca
121 ggggatttat ctattcctag ttctgagtta gaaaatattc catcggaaaa ccaatatttt
181 caatctgcta tttggtcagg atttatcaaa gttaagaaga gtgatgaata tacatttgct
241 acttccgctg ataatcatgt aacaatgtgg gtagatgacc aagaagtgat taataaagct
301 tctaattcta acaaaatcag attagaaaaa ggaagattat atcaataaa aattcaatat
361 caacgagaaa atcctactga aaaaggattg gatttcaagt tgtactggac cgattctcaa
421 aataaaaaag aagtgatttc tagtgataac ttacaattgc cagaattaaa acaaaaatct
481 tcgaaactcaa gaaaaagcg aagtacaagt gctggacctc cggttccaga ccgtgacaat
541 gatggaatcc ctgattcatt agaggtagaa ggatatacgg ttgatgtcaa aaataaaaaga
601 acttttcttt caccatggat ttctaattatt catgaaaaga aaggattaac caaatataaa
661 tcatctcctg aaaaatggag cacggcttct gatccgtaca gtgatttcga aaaggttaca
721 ggacggattg ataagaatgt atcaccagag gcaagacacc cccttggtgc agcttatccg
781 attgtacatg tagatatgga gaatattatt ctctcaaaaa atgaggatca atccacacag
841 aatactgata gtgaaacgag aacaataagt aaaaataactt ctacaagtag gacacatact
901 agtgaagtac atggaatgc agaagtgcac gcgtcgttct ttgatattgg tgggagtgta
961 tctgcaggat ttagtaattc gaattcaagt acggtcgcga ttgatcattc actatctcta
1021 gcaggggaaa gaacttgggc tgaacaatg ggtttaaata ccgctgatac agcaagatta
1081 aatgccaaata ttagatatgt aaatactggg acggctccaa tctacaacgt gttaccaacg
1141 acttcgttag tgttaggaaa aaatcaaaaca ctccgcgaca ttaaagctaa ggaaaacca
1201 ttaagtcaaa tacttgacc taataattat tatccttcta aaaacttggc gccaatcgca
1261 ttaaagcac aagacgattt cagttctact ccaattaca tgaattacaa tcaatttctt
1321 gagttagaaa aaacgaaaca attaagatta gatacggatc aagtatatgg gaatagca
1381 acatacaatt ttgaaaatgg aagagtgagg tggatcacag gctcgaactg gagtgaagtg
1441 ttaccgcaaa ttcaagaaac aactgcacgt atcattttta atggaaaaga tttaaatctg
1501 gtagaaaggc ggatagcggc ggttaatcct agtgatccat tagaaacgac taaaccggat
1561 atgacattaa aagaagccct taaaatagca tttggattta acgaaccgaa tggaaactta
1621 caatatcaag ggaaagacat aaccgaattt gattttaatt tcgatcaaca aacatctcaa
1681 aatatcaaga atcagttagc ggaattaaac gcaactaaca tatatactgt attagataaa
1741 atcaaattaa atgcaaaaat gaatatttta ataagagata aacgttttca ttatgataga
1801 aataacatag cagttggggc ggatgagtca gtagttaagg aggctcatag agaagtaatt
1861 aattcgtcaa cagagggatt attgttaaat attgataagg atataagaaa aatattatca
1921 ggttatattg tagaaattga agatactgaa gggcttaag aagttataaa tgacagatat
1981 gatatgttga atatttctag tttacggcaa gatggaaaaa catttataga ttttaaaaaa
2041 tataatgata aattaccgtt atatataagt aatcccaatt ataaggtaaa tgatatgct
2101 gttactaaag aaaacactat tattaatcct agtgagaatg gggatactag taccaacggg
2161 atcaagaaaa ttttaattct ttctaaaaaa ggctatgaga taggataa

```

(SEQ ID No 14)

ФИГ. 3 (продолжение)

```

1 FHYDRNNIAV GADESVVKEA HREVINSTE GLLLNIKDI RKILSGYIVE IEDTEGLKEV
61 INDRYDMLNI SSLRQDGKTF IDFKKYNDKL PLYISNPNYK VNVYAVTKEN TIINPSENGD
121 TSTNGIKKIL IFSKKGYEIG

```

(SEQ ID No 15)

```

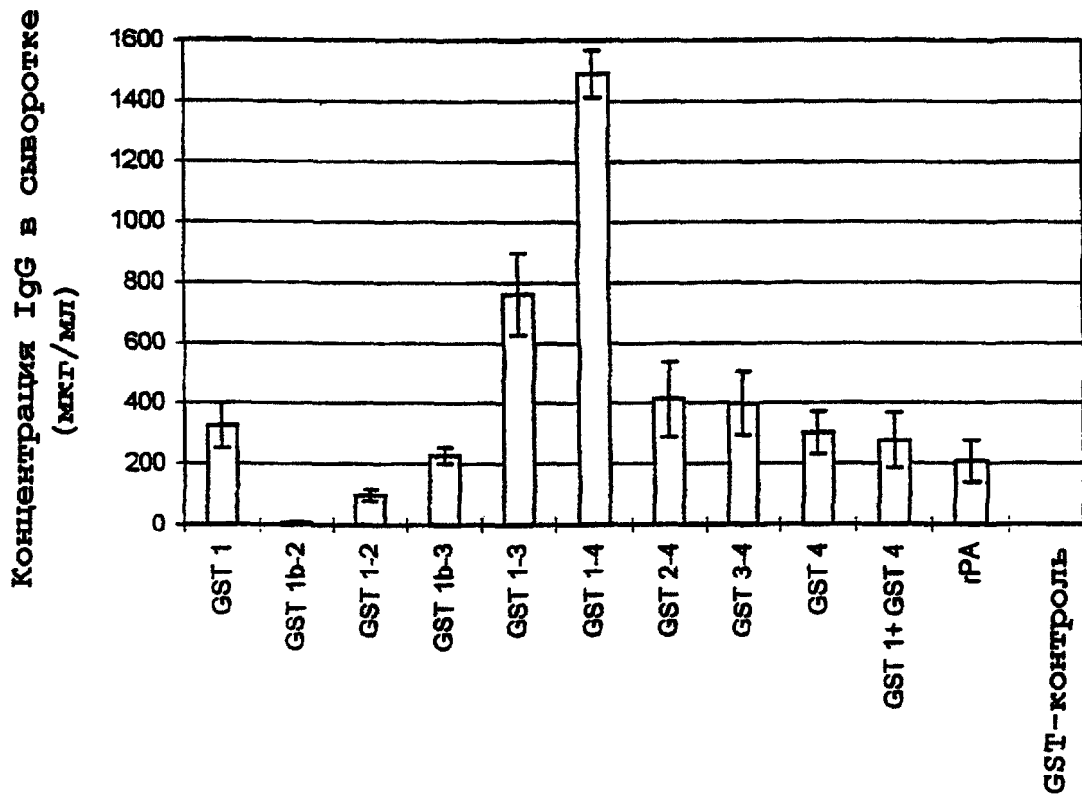
1 tttcattatg atagaaataa catagcagtt ggggcgatg agtcagtagt taaggaggct
61 catagagaag taattaattc gtcaacagag ggattattgt taaatattga taaggatata
121 agaaaaatat tatcaggtta tattgtagaa attgaagata ctgaagggct taaagaagtt
181 ataaatgaca gatatgatat gttgaatatt tctagtttac ggcaagatgg aaaaacattt
241 atagatttta aaaaatataa tgataaatta cogttatata taagtaatcc caattataag
301 gtaaagtgtat atgctgttac taagaaaaac actattatta atcctagtgga gaatggggat
361 actagtacca acgggatcaa gaaattttta atcttttcta aaaaaggcta tgagatagga
421 taa

```

(SEQ ID No 16)

ФИГ. 4

Концентрации IgG к rPA у A/J-мышей,
иммунизированных укороченными rPA



Химерные домены rPA
ФИГ. 5