



МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ
УКРАИНЫ

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(19) **UA** (11) **45 946** (13) **C2**

(51)МПК ⁷ **C 12N 15/12 A, C 12N 1/21 B,
C 12N 15/70 B, C 12N 15/79 B, C
12N 7/01 B, C 07K 14/435 B, A
61K 39/00 B, A 61K 39/395 B, C
12Q 1/68 B**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ УКРАИНЫ

(21), (22) Заявка: 94085714, 23.02.1993

(24) Дата начала действия патента: 15.05.2002

(30) Приоритет: 21.02.1992 NZ 241688

(46) Дата публикации: 15.05.2002

(86) Заявка РСТ:
РСТ/NZ93/00007, 19930223

(72) Изобретатель:

Нес Давид Дункан, NZ,
Лоуренс Стефан Бруге, NZ,
Ралстон Марк Джон, NZ,
Маасс Давид Ричард, NZ,
Лигстовлерс Маршалл Вильям, AU

(73) Патентовладелец:

НЬЮ ЗЕЛАНД ПАСТОРАЛ АГРИКАЛЧЕ РИСИЧ
ИНСТИТУТ ЛИМИТЕД, NZ,
ЮНИВЕРСИТИ ОФ МЕЛЬБУРН, AU

(54) ОЧИЩЕННЫЙ АНТИГЕННЫЙ ПОЛИПЕПТИД, ПРЕПАРАТ, СПОСОБНЫЙ СОЗДАТЬ У ЧУВСТВИТЕЛЬНОГО ХОЗЯИНА ЗАЩИТНУЮ ИММУНОЛОГИЧЕСКУЮ РЕАКЦИЮ НА ИНФИЦИРОВАНИЕ E. GRANULOSUS, МОЛЕКУЛА ДНК, МОЛЕКУЛА КДНК, РЕКОМБИНАНТНЫЙ ВЕКТОР ЭКСПРЕССИИ (ВАРИАНТЫ), КЛЕТКА-ХОЗЯИН (ВАРИАНТЫ), СПОСОБ ПРОДУЦИРОВАНИЯ АНТИГЕННОГО ПОЛИПЕПТИДА (ВАРИАНТЫ), ВАКЦИНА, РЕКОМБИНАНТНАЯ ВИРУСНАЯ ВАКЦИНА, СПОСОБ ЗАЩИТЫ ХОЗЯИНА, ЧУВСТВИТЕЛЬНОГО К ИНФИЦИРОВАНИЮ ПАРАЗИТАМИ ECHINOCOCCUS ИЛИ TAENIID ОТ ЗАРАЖЕНИЯ ЭТИМИ ПАРАЗИТАМИ (ВАРИАНТЫ), ОЧИЩЕННОЕ АНТИТЕЛО, ПРОИЗВОЛЬНО МЕЧЕННАЯ МОЛЕКУЛА ДНК, СПОСОБ ИДЕНТИФИКАЦИИ ПРОТЕКТИВНОГО АНТИГЕНА ПАРАЗИТА ECHINOCOCCUS ИЛИ TAENIID

(57) Реферат:

Выделенный антигенный полипептид или его пептидный фрагмент, или вариант, пригодный для применения в вакцинах для защиты хозяина, восприимчивого к инфицированию паразитами Echinococcus или Taeniid, в частности, инфицированию E. granulosus. Антиген можно получать экспрессией кодирующей его ДНК в рекомбинантной клетке-хозяине. Представлена

аминокислотная последовательность, которую включает антигенный полипептид.

Официальный бюлетень "Промышленная собственность". Книга 1 "Изобретения, полезные модели, топографии интегральных микросхем", 2002, N 5, 15.05.2002. Государственный департамент интеллектуальной собственности Министерства образования и науки Украины.



MINISTRY OF EDUCATION AND SCIENCE OF
UKRAINE

STATE DEPARTMENT OF INTELLECTUAL
PROPERTY

(19) **UA** (11) **45 946** (13) **C2**

(51) Int. Cl.⁷ **C 12N 15/12 A, C 12N 1/21 B,
C 12N 15/70 B, C 12N 15/79 B, C
12N 7/01 B, C 07K 14/435 B, A
61K 39/00 B, A 61K 39/395 B, C
12Q 1/68 B**

(12) **DESCRIPTION OF PATENT OF UKRAINE FOR INVENTION**

(21), (22) Application: 94085714, 23.02.1993

(24) Effective date for property rights: 15.05.2002

(30) Priority: 21.02.1992 NZ 241688

(46) Publication date: 15.05.2002

(86) PCT application:
PCT/NZ93/00007, 19930223

(72) Inventor:

Nes David Duncan, NZ,
Laurence Stephen Bruge, NZ,
Ralston Mark John, NZ,
Maass David Richard, NZ,
Ligstovlers Marshall William, AU

(73) Proprietor:

NEW ZEALAND PASTORAL AGRICULTURE
RESEARCH INSTITUTE LIMITED, NZ,
UNIVERSITY OF MERBOURNE, AU

(54) PURIFIED ANTIGEN POLYPEPTIDE, PREPARATION ABLE TO CREATE AT SENSIBLE HOST A PROTECTIVE IMMUNOLOGICAL REACTION AGAINST INFECTION E. GRANULOSUS, DNA MOLECULE, CDNA MOLECULE, RECOMBINANT EXPRESSION VECTOR (VARIANTS), HOST CELL (VARIANTS), METHOD OF PRODUCING OF ANTIGEN POLYPEPTIDE (VARIANTS), VACCINE, RECOMBINANT VIRAL VACCINE, METHOD OF PROTECTION OF HOST SENSITIVE TO INFECTION BY PARASITES ECHINOCOCCUS OR TAENIID FROM INFECTION BY THESE PARASITES (VARIANTS), PURIFIED ANTIBODY, AD ARBITRIUM LABELED DNA MOLECULE, METHOD OF IDENTIFICATION OF PROTECTIVE ANTIGEN OF PARASITE ECHINOCOCCUS OR TAENIID

(57) Abstract:

Isolated antigen polypeptide or its peptide fragment or its variant suitable for use in vaccines for protection of host susceptible to infection by parasites Echinococcus or Taeniid, in particular, infection by granulosus. Antigen may be obtained by expression of its coding DNA in recombinant host cell. Aminoacid succession

that includes antigen polypeptide.

Official bulletin "Industrial property". Book 1 "Inventions, utility models, topographies of integrated circuits", 2002, N 5, 15.05.2002. State Department of Intellectual Property of the Ministry of Education and Science of Ukraine.



МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ

(19) **UA** (11) **45 946** (13) **C2**

(51)МПК ⁷ **C 12N 15/12 A, C 12N 1/21 B,
C 12N 15/70 B, C 12N 15/79 B, C
12N 7/01 B, C 07K 14/435 B, A
61K 39/00 B, A 61K 39/395 B, C
12Q 1/68 B**

(12) ОПИС ВІНАХОДУ ДО ПАТЕНТУ УКРАЇНИ

(21), (22) Дані стосовно заявки:
94085714, 23.02.1993

(24) Дата набуття чинності: 15.05.2002

(30) Дані стосовно пріоритету відповідно до Паризької
конвенції : 21.02.1992 NZ 241688

(46) Публікація відомостей про видачу патенту
(деклараційного патенту): 15.05.2002

(86) Номер та дата подання міжнародної заявки
відповідно до договору РСТ:
PCT/NZ93/00007, 19930223

(72) Винахідник(и):

Нес Давід Дункан, NZ,
Лоуренс Стефан Бруге, NZ,
Ралстон Марк Джон, NZ,
Маасс Давід Річард, NZ,
Лігстовлерс Маршалл Вільям, AU

(73) Власник(и):

НЬО ЗЕЛАНД ПАСТОРАЛ АГРІКАЛЧЕ РІСІЧ
ІНСТІТЮТ ЛІМІТЕД, NZ,
ЮНІВЕРСИТЕТІ ОФ МЕЛЬБУРН, AU

(54) ОЧИЩЕНИЙ АНТИГЕННИЙ ПОЛІПЕПТИД, ПРЕПАРАТ, ЗДАТНИЙ СТОРІТИ У ЧУТЛИВОГО ХАЗЯЇНА ЗАХІСНУ ІМУНОЛОГІЧНУ РЕАКЦІЮ НА ІНФІКУВАННЯ E. GRANULOSUS, МОЛЕКУЛА ДНК, МОЛЕКУЛА КДНК, РЕКОМБІНАНТНИЙ ВЕКТОР ЕКСПРЕСІЇ (ВАРІАНТИ), КЛІТИНА-ХАЗЯЇН (ВАРІАНТИ), СПОСІБ ПРОДУКУВАННЯ АНТИГЕННОГО ПОЛІПЕПТИДУ (ВАРІАНТИ), ВАКЦИНА, РЕКОМБІНАНТНА ВІРУСНА ВАКЦИНА, СПОСІБ ЗАХІСТУ ХАЗЯЇНА, ЧУТЛИВОГО ДО ІНФІКУВАННЯ ПАРАЗИТАМИ ECHINOCOCCUS АБО ТАЕНІІД ВІД ЗАРАЖЕННЯ ЦИМИ ПАРАЗИТАМИ (ВАРІАНТИ), ОЧИЩЕНЕ АНТИТІЛО, ДОВІЛЬНО МІЧЕНА МОЛЕКУЛА ДНК, СПОСІБ ІДЕНТИФІКАЦІЇ ПРОТЕКТИВНОГО АНТИГЕНУ ПАРАЗИТУ ECHINOCOCCUS АБО ТАЕНІІД

(57) Реферат:

Виділений антигенний поліпептид або його пептидний фрагмент, або варіант, придатний для застосування у вакцинах для захисту хазяїна, який є сприйнятливим до інфікування паразитами

Echinococcus чи Taeniid, зокрема, інфікуванню E.granulosus. Антиген можна одержувати експресією, що кодує його ДНК у рекомбінантній клітці-хазяїні. Представлено амінокислотну послідовність, що включає антигенний поліпептид.

Опис винаходу

Настоящее изобретение относится к антигенам, являющихся защитными от, *inter alia*, инфекции *Echinococcus granulosus*, к вакцинам, содержащим подобные антигены, и к способам защиты хозяев, подверженных заражению паразитами *Echinococcus granulosus* и *Taenii*.

Предпосылки изобретения.

Эхинококкоз возникает в результате заражения личинками (метацестодная стадия) ленточных червей, принадлежащих к роду *Echinococcus*. Переход происходит в момент поедания хищником добычи, т. е. от травоядных или всеядных промежуточных хозяев к плотоядным окончательным хозяевам.

Из ленточных червей рода *Echinococcus* наибольший интерес представляют *Echinococcus granulosus*. *E. Granulosus* является возбудителем поликистозного эхинококкоза (ПКЭ), для которого характерен обмен между домашней собакой и домашними травоядными животными, например: овцами и крупным рогатым скотом, причем человек также может служить промежуточным хозяином для паразита, но обычно не играя важной роли в его жизненном цикле. Соответственно, *E. granulosus* географически широко распространен и в его размещении наблюдается явная параллель с теми областями мира, в которых скотоводство является основным занятием. Таким образом, можно предсказать, что ПКЭ является распространенным эндемическим заболеванием на больших территориях Южной Америки, Африки, Австралии, Центральной Европы, Центральной Азии, прибрежного Средиземноморья, включая Северную Африку.

В некоторых странах в настоящее время пытаются вести борьбу с ПКЭ путем разъяснительных бесед с хозяевами собак и регулярной антигельминтной обработки собак в качестве окончательных хозяев паразита. Однако, хотя подобные программы, как правило, частично успешны, полного истребления паразита оказалось гораздо труднее достигнуть.

Другой желательный подход в борьбе с ПКЭ состоит в применении вакцины, направленной против кистозной стадии жизненного цикла *E. granulosus* у восприимчивых к нему промежуточных хозяев. Значительное преимущество такого подхода заключается в том, что при этом предотвращается передача инфекции собаке при поедании ею содержащих кисту потрохов промежуточного хозяина. Как следствие, искоренение болезни становится реальной возможностью.

В широком смысле именно на применение вакцины и направлено настоящее изобретение.

Однако, для создания промышленной вакцины существенное значение имеет идентификация характерных защитных антигенов против *E. granulosus*. Хотя проведенные к настоящему времени исследования (Gemmell M. A., Immunology 11, 325 - 335 (1966), Heath и др., J. Parasitol 67, 797 - 799 (1981)) ясно показали, что онкосферы *E. granulosus* являются мощным источником таких антигенов, никаких характерных антигенов онкосфер *E. granulosus* обеспечивающих защиту, идентифицировано не было.

Заявка на Международный патент №РСТ/ГР91/00563 (публикация 092/01051) раскрывает иммуногенный *E. granulosus* пептид, а также кодирующую этот пептид ДНК-последовательность и способы, как диагностики, так и борьбы с инфекцией *E. granulosus* с применением данного пептида.

Однако, описанный *E. granulosus* антиген (известный под названием "антиген 5") не имеет отношения к антигенам онкосфер, исследуемых заявителями. Более того, заявителями в их опубликованном исследовании показано, что присутствие антител к антигену 5 не защищает ягнят при контрольном заражении яйцами *E. Granulosus* (Heath др., Intl. Journal of Parasitology 22, 1017 - 1021 (1992)).

Краткое изложение сущности изобретения

Таким образом, цель настоящего изобретения состоит в получении особого антигена для применения в вакцине, обеспечивающей защиту от заражения *E. granulosus*, или хотя бы обеспечении общества правом полезного выбора.

Соответственно, одним из аспектов изобретением дается по существу в чистом виде антигенный полипептид с молекулярной массой в интервале 23 - 25кД (при определении методом НДС-ПАГЭ), включающий аминокислоты 4 - 77 из приведенной на Фиг.4 последовательности, способный создавать иммунологическую реакцию на инфицирование *E. Granulosus* у восприимчивых к заражению хозяев, или фрагмент или вариант пептида, обладающей, эквивалентной защитной иммунологической активностью.

В предпочтительном воплощении изобретения полипептид включает аминокислоты 1 - 154 из приведенной на Фиг.4 последовательности.

В еще более предпочтительном воплощении изобретения пептид представляет собой фрагмент, включающий часть или всю аминокислотную последовательность с Фиг.4.

Удобно то, что полипептид или фрагмент пептида является продуктом экспрессии в клетке-хозяине кодирующих их; нуклеотидной последовательности.

Другим своим аспектом изобретение направлено на препарат, способный создавать защитную иммунологическую реакцию на инфицирование *E. granulosus* восприимчивых к заражению хозяев, причем препарат включает компонент, выбранный из группы, включающей:

- (а) выше охарактеризованный полипептид,
- (в) пептидный фрагмент полипептида (а), обладающий эквивалентной иммунологической активностью, и
- (с) вариант (а) или (в), модифицированный вставкой, замещением или делецией одной или нескольких аминокислот и обладающий хотя бы эквивалентной иммунологической активностью.

И еще одним аспектом изобретением дается молекула ДНК, выбранная из группы, включающей:

- (а) нуклеотидную последовательность, кодирующую выше охарактеризованный антигенный полипептид,

(в) нуклеотидную последовательность, кодирующую пептидный фрагмент антигенного полипептида (а), причем фрагмент обладает эквивалентной с полипептидом (а) защитной иммунологической активностью, и

(с) нуклеотидную последовательность, кодирующую вариант полипептида (а) или пептида (в), в котором аминокислотная последовательность модифицирована вставкой, замещением или делецией одной или нескольких аминокислот, при этом вариант обладает эквивалентной с полипептидом (а) или пептидным фрагментом (в) защитной иммунологической активностью.

В рекомендуемом воплощении изобретения молекула ДНК включает хотя бы нуклеотиды 10 - 233 из приведенной на Фиг.4 последовательности, более предпочтительно нуклеотиды 3 - 461 последовательности с Фиг.4 и наиболее предпочтительно нуклеотиды 1 - 461 последовательности с Фиг.4.

Другими своими аспектами изобретением даются рекомбинантные экспрессионные векторы, содержащие выше охарактеризованную молекулу ДНК, клетки-хозяева, трансформированные такими векторами и способные экспрессировать закодированные полипептид или его пептидный фрагмент, или его вариант, а также способы продуцирования антигенного полипептида или его пептидного фрагмента, или его варианта, состоящие в культивировании выше охарактеризованной клетки-хозяина и выделении продукта экспрессии.

Другим своим аспектом изобретением дается вакцина против инфицирования *E. granulosus*, содержащая выше охарактеризованные полипептид *E. granulosus*, пептидный фрагмент или вариант, в смеси с иммунологически приемлемым адъювантом или носителем.

И еще одним своим аспектом изобретением дается способ защиты восприимчивых хозяев от инфицирования *Echinococcus* или *Taeniid* паразитами, включающий этап введения указанному хозяину такого количества выше охарактеризованных полипептида, пептидного фрагмента или варианта, которое обеспечивает защиту от заражения.

Полипептид, пептидный фрагмент или вариант удобно вводить указанному хозяину в виде выше охарактеризованной вакцины.

Еще одним аспектом изобретением дается антитело, специфичное к выше охарактеризованному антигенному полипептиду или к его пептидному фрагменту, или к его варианту.

Прочие воплощения изобретения станут очевидными из последующего описания.

Пояснения, к диаграммам

Хотя изобретение достаточно широко охарактеризовано выше, для специалиста понятно, что изобретение не ограничивается приведенной характеристикой, но включает также варианты, для которых в последующем описании приводятся примеры. В частности, лучшему пониманию настоящего изобретения способствует ссылка на прилагаемые диаграммы.

Фиг.1 показывает IgG_1 и IgG_2 реакцию овечьих антител на вакцинацию полученными, методом препаративного НДС-ПАГЭ фракциями онкосфер. Группы овец вакцинируют фракциями онкосфер, представляющими полученные методом НДС-ПАГЭ фракции, включающими антигены с установленной молекулярной массой. Группа 1: все молекулы имеют массу ниже 21кД, группа 2: 23 + 25кД, группа 3: 30кД, группа 4: 34кД, группа 5: 40кД дублет, группа 6: 43кД, группа 7: все молекулы имеют массу выше 43кД, группа 8: смесь всех молекул, группа 9: только адъювант, в группе 10 овцы вакцинированы нефракционированными онкосферами, а в остальном обработаны точно также, как овцы групп 1 - 9 и группа 21 вакцинирована замороженным-оттаянным продуктом обработки ультразвуком активированных онкосфер *E. granulosus*. На Фиг.1 приведен анализ реакции антител овец в каждой из указанных групп, реагирующих с полными экстрактами онкосфер, полученными методом НДС-ПАГЭ.

Фиг.2 показывает IgG_1 и IgG_2 реакцию овечьих антител на вакцинацию клонированными антигенами. Группы: II, клон S₂, 12 клон S₃, 13, клон 48, 14, клон 95, 15, клон 101, 16, клон 119, 17, клон 123, 18, смесь клонов, 19, клоны 33, 42 и 85, 20, GST - контроль, 21, объединенная сыворотка от 5 овец, иммунизированных замороженным-оттаянным продуктом обработки ультразвуком активированных онкосфер *E. granulosus*. Методика иммунизации аналогична методике, применяемой для антигенов групп 11 - 20.

Фиг.3 показывает реакцию овечьего IgG_2 , на вакцинацию полученными препаративным НДС-ПАГЭ фракциями антигенов онкосфер или клонированными антигенами. Группы те же, что и выше.

На Фиг.4 приведена нуклеотидная последовательность и выведенная на ее основе аминокислотная последовательность пептидного фрагмента защитного антигена изобретения. Цифрами с левой стороны указаны номера нуклеотидов от 5' к 3'-концу, цифрами с правой стороны указаны номера аминокислот. Трансляционный терминационный кодон подчеркнут.

Подробное описание изобретения

Как указано выше, в своем основном аспекте изобретение направлено на создание антигена, способного защищать хозяина от инфицирования *E. granulosus* независимо от того, заражен ли хозяин червем или заражение, находится на стадии цисты. К хозяевам, восприимчивым к инфицированию *E. granulosus*, относятся млекопитающие, включая и человека. Соответственно, примеры хозяев, для которых потенциально применимо настоящее изобретение, включают: овец, коров, свиней, коз, лошадей и человека.

В своих исследованиях заявители идентифицировали *E. granulosus* полипептид, способный участвовать в защите восприимчивого к инфицированию *E. granulosus* хозяина. Такой *E. granulosus* полипептид - это полипептид, молекулярная масса которого находится в интервале 23 - 25кД.

Настоящее изобретение включает в свой объем антигены, происходящие из нативного *E. granulosus* полипептида, охарактеризованного выше, причем такие производные обладают защищающей хозяина активностью. Подобные производные обычно представляют собой пептидные фрагменты нативного полипептида, содержащими защитный эпитоп, но могут быть также и функционально эквивалентными

вариантами нативного полипептида, модифицированного хорошо известными методами, например, сайт-специфичным мутагенезом (см. Adelman и др., DNA2, 183 (1983)). К примеру, применением подобных методов можно заменить в последовательности одни аминокислоты на другие эквалентные аминокислоты. Группы аминокислот, для которых известна эквивалентность, включают:

- (a) Ala Ser Thr Pro Gly
- (b) Asn Asp Glu Gln
- (c) His Arg Lys
- (d) Met Leu Ile Val;
- (e) Phe Tyr Trp.

В предпочтительном воплощении изобретения антиген представляет собой пептидный фрагмент, включающий часть или всю аминокислотную последовательность, приведенную на Фиг.4. Более предпочтительно, если пептидный фрагмент состоит из аминокислот 4 - 77 последовательности с Фиг.4. Иде более предпочтительно, если пептидный фрагмент состоит из аминокислот 1 - 77 из последовательности с Фиг.4. Наиболее предпочтительно, однако, если пептидный фрагмент состоит из - аминокислот 1 - 153 последовательности, приведенной на Фиг.4.

Защитный антиген изобретения может быть получен выделением комплемента из нативных онкосфер E. granulosus использованием обычных методов очистки. Тем не менее, общепризнано, что для получения антигена в промышленных масштабах желателен синтетический путь его получения. Подобные пути синтеза включают поэтапный твердофазный подход, описанный в работе Merryfield J. Amer. Chem. Soc. 85, 2149 - 2156 (1963)), и получение применением методов биотехнологии. Последний путь, в частности, и был применен заявителями.

В еще одном своем аспекте изобретение, соответственно, относится к продуцированию рекомбинантными методами выше охарактеризованных антигенных полипептида или пептида.

В общем смысле продуцирование защитного антигена изобретения методами биотехнологии включает трансформирование приемлемого микроорганизма-хозяина или клетки-хозяина экспрессионным вектором, содержащим кодирующую антиген ДНК-последовательность, с последующим культивированием трансформированного хозяина и затем выделением экспрессированного антигена. Подобные методы в; целом представлены в работе Sambrook и др., "Молекулярное клонирование", второе издание, Коулд Спринг Харбор Пресс (1987).

Начальный этап метода рекомбинантного продуцирования антигена включает легирование кодирующей антиген ДНК-последовательности в приемлемый экспрессионный вектор, содержащий промотор к участок связывания с рибосомой, работающими в клетке-хозяине, в которой будет трансформирована кодирующая последовательность. Наиболее обычные примеры таких экспрессионных векторов включают плазмиды, представляющие собой двуцепочечные ДНК-петли, автономно-реплицирующиеся в клетке-хозяине. Однако необходимо указать, что при осуществлении изобретения могут быть использованы и другие, отличные от плазмид приемлемые векторы.

Рекомендуется, чтобы клетка-хозяин, в которой клонируется и экспрессируется кодирующая полипептид ДНК-последовательность, была прокариотной, например, E. coli. Например, могут быть использованы E. Coli H5 (Raleigh E. A., и др., Nucleic Acid Research 16 (4) 1563 - 1575 (1988)). E. Coli K12 штамм 294 (ATCC31446), E. coli. B, E. coli. X1776 (ATCC 31537), E. coli. штамм ST9 или E. coli. JM101. Могут быть также использованы и другие прокариоты, например: бациллы, такие как Bacillus subtilis и энтеробактерии, такие как Salmonella typhimurium, Serratia marcescens или ослабленный штамм Mycobacteriumbovis под названием Бацилла Calmette-Guerin (BCG).

В целом, если клетка-хозяин является прокариотом, при меняют экспрессионные или клонирующие вектора, содержащие репликационные или контрольные последовательности, происходящие из видов, совместимых с клеткой-хозяином. Вектора кроме того могут нести маркерные последовательности, способные обеспечить фенотипный отбор трансформированных клеток. К примеру, E. coli. обычно трансформируют плазмидой rBP322., происходящей из видов E. coli. (Bolivar и др., Gene 2, 95 (1977)). Плазмида rBP322 содержит гены устойчивости к ампициллину и тетрациклину, в силу чего обеспечивает средства легкого обнаружения трансформированных клеток.

Для применения в экспрессии плазмида, содержащая экспрессируемую ДНК, включает в себя промотор. Промоторы, наиболее часто применяемые в рекомбинантных ДНК конструкциях, предназначенных для прокариотных хозяев, включают β-лактамазу (пенициллиназу) и лактозные промоторные системы (Chang и др., Nature 275, 615 (1978), Itakura и др., Science 198, 1056 (1977), Goedel и др., Nature 281, 544 (1979)) и триптофановую (ltp) промоторную систему (Goedel и др. Nucleic Acid Res 8, 4057 (1980), EPO №Публ. 0036776). Хотя вышеприведенные промоторы применяются наиболее часто, были сконструированы и применены и другие микробальные промоторы, например, lac промотор (Amann и др., Gene 25, 167 - 178 (1983)), подробности, касающиеся их нуклеотидных последовательностей, опубликованы, что позволяет специалисту лигировать их функционально методами геной инженерии с генами в векторах (Siebenlist и др., Cell 20, 269 (1980)).

Помимо прокариотов могут быть также применены эукариотные микробы, например, дрожжи. Из эукариотных микроорганизмов наиболее часто применяют Saccharomyces cerevisiae или обычные пекарские дрожжи, хотя легко доступен целый ряд других штаммов. Для экспрессии в Saccharomyces наиболее часто применяют, например, плазмиду YPp7 (Stinchomb и др., Nature 282, 39 (1979), Kingsman и др., Gene 7, 141 (1979),

7Tschemper и др., Gene 10, 157 (1980)). Данная плаزمида уже содержит trp1 ген, обеспечивающий маркер для отбора мутантного штамма дрожжей, не обладающего способностью, расти в триптофана, например: ATCC №44076 или PER4-1 (Jones, Genefics 85, 12 (1977)). Наличие trp1 повреждения в качестве характеристики генома дрожжевых клеток-хозяев обеспечивает эффективное средство обнаружения трансформации по росту в отсутствии триптофана.

Приемлемые промотирующие последовательности в дрожжевых векторах включают промоторы для 3-фосфоглицерат-киназы (Hitzeman и др., J. Biol. Chem. 255, 2073 (1980)) или других гликолитических ферментов (Hess и др., J. Aov. Enzyme Red 7, 149 (1968), Holland и др., Biochemistry 17, 4900 (1978)).

К другим промоторам, обладающим дополнительным преимуществом транскрипции, регулируемой условиями роста, относятся промотирующая область для спиртовой дегидрогеназы, изоцитохром C, кислая фосфатаза, разрушающие ферменты, связанные с метаболизмом азота, и вышеупомянутая: глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназа, а также ферменты, ответственные за усвоение мальтозы и галактозы. Приемлем любой плазмидный вектор, содержащий совместимый с дрожжами промотор, ориджин репликации а терминирующие последовательности.

Помимо микроорганизмов в качестве хозяев могут быть использованы культуры клеток, происходящие из многоклеточных организмов, например: млекопитающих или насекомых. В принципе, срабатывает любая такая клеточная культура, как от позвоночных, так и беспозвоночных. Однако, наибольший интерес представляют клетки позвоночных, и размножение клеток позвоночных в культуре (тканевая культура) стала обычной процедурой в последние годы (Тканевые культуры. Академик Пресс, под ред. Kruse и Patterson, (1973). Примеры таких применимых линий клеток хозяев включают: VERO и HELA клетки и клетки яичников китайского хомячка (CHO клетки). Экспрессионные векторы для таких клеток включают (если необходимо): ориджин репликации, промотор, расположенный в восходящем направлении от экспрессируемого гена, а также любые необходимые участки связывания рибосомы, сайты полиаденширования и последовательности терминации транскрипции.

При использовании в клетках млекопитающих регулирующие функции в экспрессионных векторах часто обеспечивают вирусным материалом. Например, обычно применяемые промоторы происходят из полиомы, аденовируса 2 и наиболее часто из обезьяньего вируса 40 (OB40). Особенно полезны ранний и поздний промоторы OB40, поскольку оба легко могут быть получены из вируса в виде фрагмента, содержащего также вирусный ориджин репликации OB40 (Fiers и др., Nature 273, 113 (1978)). Могут быть использованы также меньшие и более крупные фрагменты OB40 при условии, что они включают в себя последовательности примерно в 250 п. о., простирающуюся от Hind111 в направлении Bg11 сайта, расположенного в вирусном ориджине репликации. Кроме того, возможно также, а часто и желательно использовать промотор или регулирующие последовательности, обычно связанные с последовательностью целевого гена, при условии, что такие регулирующие последовательности совместимы с системами клетки-хозяина.

Ориджин репликации может быть обеспечен либо конструированием вектора, включающего экзогенный ориджин, происходящий, например, из OB40 или иного вирусного источника (напр.: полиомы, аденовируса, VSV, BPV), либо хромосомным механизмом репликации клетки-хозяина. Если вектор интегрирован в хромосому клетки-хозяина, этого часто достаточно.

После трансформации выбранного хозяина соответствующим вектором закодированные антигенные полипептид или пептид могут быть получены культивированием клетки-хозяина. В результате выделяют слитый белок.

После выделения антигенные полипептид или пептид при желании очищают. Принятая методика очистки, разумеется, будет зависеть от степени чистоты, необходимой от той области применения, для которой полипептид или пептид предназначены. Для большинства целей вакцинации достаточно отделить слитый белок от большей части остальных компонентов клеточной культуры, поскольку антиген может быть введен в вакцину в сравнительно сырой форме. Однако, в случаях, если требуется более высокая степень чистоты, несущий компонент слитого белка может быть отщеплен от антигенного компонента. И вновь, как будет показано приведенными характерными примерами, этого легко достигнуть созданием соответствующего участка ферментативного расщепления между несущим компонентом и антигеном.

Если, как и рекомендуется, для продуцирования антигенного пептида применяются методы биотехнологии, первый этап состоит в получении ДНК, кодирующей целевой продукт. Такие молекулы ДНК составляют еще один аспект настоящего изобретения.

Молекула ДНК изобретения предпочтительно включает хотя бы часть или всю нуклеотидную последовательность, приведенную на Фиг.4. В одном из вариантов молекула ДНК включает нуклеотиды 10 - 233 последовательности с Фиг.4. В более предпочтительном варианте молекула ДНК включает нуклеотиды 3 - 233 последовательности с Фиг.4. Однако, наиболее предпочтительно, если молекула ДНК состоит из нуклеотидов 3 - 461 последовательности с Фиг.4, если не полной нуклеотидной последовательности, приведенной на Фиг.4.

ДНК молекула изобретения может быть получена в виде части, содержащейся в пределах ДНК молекулы, выделенной из соответствующего природного источника, или же может быть получена в виде безинтронной ДНК применением обычных методов, например, приведенных в нижеследующем специальном описании. Рекомендуется КДК.

Однако, как указано выше, настоящее изобретение включает также варианты полипептида, отличающиеся от нативных аминокислотных последовательностей вставкой, замещением или делецией одной или нескольких аминокислот. Если желателен такой вариант, изменяют нуклеотидную последовательность нативной молекулы ДНК. Подобное изменение в молекулу может быть внесено избирательным синтезом ДНК с помощью соответствующего синтезатора, например, ДНК синтезатора фирмы Эпплайд Биосистемс или, например,

сайт-специфичным или кассетным мутагенезом с модификацией нативной ДНК.

После получения молекулу ДНК подготавливают для вставки вместе с выбранной регулирующей последовательностью в соответствующий клонирующий и/или экспрессионный вектор. Для этого ДНК

расщепляют, наращивают и религируют по мере необходимости. Расщепление проводят обработкой ДНК ферментами рестрикции в приемлемом буфере. Любой из большого числа промышленных ферментов рестрикции может быть использован согласно указаниям изготовителя. После расщепления нуклеиновую кислоту выделяют, например, осаждением этанолом.

Наращивание расщепленной ДНК осуществляют обычными методами. К примеру, если необходимы тупые концы, ДНК может быть обработана ДНК-полимеразой 1 (полимераза Кленова), экстрагирована фенолом и хлороформом и осаждена этанолом.

Религация может быть проведена добавлением эквимоллярных количеств целевых компонентов, соответствующим образом наращенных для необходимого соответствия, и обработкой приемлемой лигазой (напр., T₄ ДНК-лигазой).

Помимо защитных антигенов изобретения и способа их получения настоящим изобретением дается вакцина от инфицирования *E. granulosus*. Такая вакцина включает в качестве необходимого компонента защищающее хозяина количество вышеуказанных *E. granulosus* полипептида, пептидного фрагмента или варианта в смеси с приемлемым адъювантом или носителем.

Примеры приемлемых, известных специалистам адъювантов включают: сапонины (или их производные или родственные им продукты), мурамилдипептид, димиколлат, трегалозы, полный адъювант Фрейнда, неполный адъювант Фрейнда, другие эмульсии типа вода в масле, декстран, диэтиламиноэтилдекстран, алюминат калия, фосфат алюминия, гидроксид алюминия, бентонит, зимозан, полиэлектролиты, ретинол, фосфат кальция, протамин, саркозин, глицерин, сорбит, пропиленгликоль, нелетучие масла и синтетические эфиры высших жирных кислот. В частности, найдено, что сапонины являются особенно эффективными адъювантами.

В других вариантах вакцина может дополнительно содержать иные лечебные для хозяина средства. Такие лечебные для хозяина средства включают противогельминтные или другие вакцины или иммуностимуляторы, например: интерфероны или интерлейкины.

Вакцина может быть введена хозяину любым известным специалисту способом. Тем не менее рекомендуется парентеральный путь введения вакцины. Термин "парентеральный" в применяемом здесь значении означает внутривенную, внутримышечную, подкожную и подкожную инъекцию. Наиболее удобный путь введения подкожный.

Количество вводимой хозяину вакцины зависит от типа, размера и массы тела хозяина, а также от иммуногенности вакцины. Удобно готовить вакцину таким образом, чтобы сравнительно небольшие дозировки вакцины (1 - 5мл) были достаточными для защиты.

Вакцина также может иметь вид живой рекомбинантной вирусной вакцины, включающей нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид, пептид или вариант. Вакцину вводят хозяину в таком виде, и уже в самом хозяине происходит экспрессия закодированных полипептида, пептидного фрагмента или варианта, создающих защищающую хозяина реакцию.

Известен ряд таких систем живых рекомбинантных вирусных вакцин. Примером подобной системы является система вируса *Vaccinia* (Патент США 4603112, и др., *Nature* 354, 520 (1991)).

Еще одним своим аспектом изобретением дается способ за щиты хозяина, восприимчивого к инфицированию паразитами *Echinococcus* и *Taeniid*. Способ изобретения включает в качестве необходимого этапа введение хозяину антигенного полипептида или пептидного фрагмента, или варианта как таковых, либо введение вышеописанной вакцины.

Хотя нижеследующие характерные примеры раскрывают применение антигенов изобретения только в защите от инфицирования *E. granulosus*, для специалиста понятно, что применением антигенов, происходящих от одного вида паразитов, может быть достигнута защита от перекрещивающихся видов (см., например, *Lightowers, Acta Leidensia* 57. 135 - 142 (1989)). В связи с этим понятно, что антигены изобретения являются кандидатами в защитные антигены хотя бы от следующих, отличных от *E. granulosus*, *Echinococcus* или *Taeniid* паразитов: *E. Multilocularis*, *E. vogelii*, *T. Ovis*, *T. Saginata*, *T. solium*, *T. Milticeps* и *T. hyoatigeni*.

В качестве еще одного аспекта изобретения предлагается применение вышеописанной молекулы ДНК или ее субпоследовательности в качестве зонда. Согласно этому аспекту, молекулу ДНК применяют для идентификации путем гибридизации с ДНК *Echinococcus* или *Taeniid* паразита, например: *T. saginata*, *T. hydatigena* или *E. multilocularis*, кодирующей иммуногенный антиген данного паразита. Этим путем могут быть выявлены дополнительные антигены паразита, пригодные для применения в вакцине.

Способ применения в качестве зонда молекулы ДНК изобретения не требует разъяснения для специалиста. К примеру, может быть применена методика, предложенная и др., "Молекулярное клонирование, лабораторное руководство", Коулд Спринг Харбор (1982).

Или же для выявления гомологичных ДНК других паразитов может быть применен способ амплификации ДНК, например, полимеразной цепной реакцией (Saiki и др., *Science* 239, 487 (1988)) с ПЦР праймерами, основанными на нуклеотидной последовательности приведенной на Фиг.4.

Аналогично применению молекул ДНК изобретения для выявления ДНК, кодирующих соответствующий защитный антиген других паразитов, антитела-зонды со специфичностью к защитным антигенам изобретения могут быть использованы для отбора антигенов, экспрессируемых микроорганизмами, траке сформированными ДНК рассматриваемого паразита. Местоположение положительного клона (клона, экспрессирующего антиген, распознаваемый антителом) позволяет идентифицировать как сам защитный антиген, так и кодирующую его

ДНК. Такие антитела-зонды могут быть и поликлональными, и моноклональными, и могут быть получены любым известным способом. В частности, моноклональные антитела могут быть получены по методике Kohler и Milstein (Kohler и Milstein С. "Непрерывные культуры слитых клеток, секретирующих антитела заданной специфичности", Nature 256. 495 - 497 (1975)).

Иммуногенность антигенного полипептида изобретения и пептидных фрагментов этого полипептида станет очевидной из следующих, неограничивающих изобретение примеров.

ПРИМЕР 1

Испытания антигенов, полученных из онкосфер *echinococcus granulosus* препаративным НДС-ПАГЕ методом.

Предшествующее исследования заявителей, о которых не сообщалось, привели в идентификации ряда кандидатов в защитные антигены из *E. granulosus*. Эти кандидаты в защитные антигены имели следующие молекулярные массы, определенные методом НДС-ПАГЭ:

23 - 25кД

30кД

34кД.

40кД.

Для выявления из вышеприведенных кандидатов защищающего хозяина антигена - (ов) заявителями проведены следующие эксперименты.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Препаративный гель. Применением НДС препаративной ячейки (Биорад) в камеру на 32мм на высоту 5,5см наливают 50мл 15%-го раствора полиакриламида. После отстаивания верхнюю часть заливают 8мл концентрирующего геля и оставляют отстаиваться.

Антиген. Девять миллионов проклюнувшихся онкосфер получают следующим образом. Подсчитывают яйца *E. granulosus* с полностью развитыми эмбриофорами и необходимое число яиц (из расчета на 20%-ый выход активированных онкосфер) помещают в разовые пластиковые центрифужные пробирки на 15мл (Фалькон Пластике). В каждую пробирку помещают не более 500000. Яйца центрифугируют 2млн при 200g, надосадочную жидкость отбрасывают и при 37°C добавляют 10мл искусственного желудочного сока (ИЖС), пропущенного через мембрану на 0,2 микрона (Heefh D. D. и Smyfh J. D. In vitro культивирование *Echinococcus granulosus*, *T. alnia hydafiglua* T. Ovis, T. Pisiformis и T. scialis из онкосферы дицистной личинки, *Parasitology* 61, 329 - 343 (1970). Пробирки перемешивают в роторе 1ч при 37°C.

Яйца центрифугируют 2мин при 200g, надосадочную жидкость отбрасывают и заменяют при 37°C 10мл искусственного желудочного сока (ИЖС) (Heafh и Smyfh см. выше), пропущенного через мембрану на 0,2 микрона. Яйца перемешивают 30мин при 37°C в роторе, после чего центрифугируют 2мин при 1000g. Надосадочную жидкость отбрасывают и заменяют 15мл Перколля (Франция, Швеция), разбавленного септически в отношении 9 : 1 (об/об) 10х концентрированным NCTC135 (Гибко, Н - И) Эмбриоформные блока, активированные и неактивированные онкосферы, образующие осадок смешивают с Перколлем инверсией. Затем пробирки центрифугируют 10мин при 1000 g и надосадочную жидкость, содержащую онкосферы, из каждой пробирки пипеткой переносят в новые стерильные центрифужные пробирки на 15мл. Половину надосадочной жидкости (7,5мл) пипеткой переносят в другую стерильную центрифужную пробирку и в каждую из двух пробирок добавляют по 7,5мл NCTC135. Пробирки перемешивают инверсией и центрифугируют 5мин при 1000g. Надосадочные жидкости удаляют, а содержащее онкосферы осадка промывают 2х по 10мл NCTC135, центрифугируя каждый раз 2мин при 1000g. Наконец осадок суспендируют в соответствующем количестве NCTC с получением в результате образцов по 10 микролитров, содержащих 40 - 200 онкосфер. Затем определяют число активированных и неактивированных онкосфер подсчетом всего объема 4 x 10 микролитров образцов, нанесенных на обе стороны двух слайдов гемоцитометра (Импрувд Найбауэр) при 200-кратном увеличении, позволяющем отличать неактивированные онкосферы от онкосфер, лишенных своих онкосферальных мембран (активированные онкосферы).

Отделение белка онкосфер. Онкосферы (прим. 50% неактивированных и 50% активированных) кипят в НДС образцовом буфере (Laemmli J. K.). Расщепление структурных белков в ходе сборки головки бактериофага T4, Nature (Лонд) 277, 680 - 685 (1970), содержащим дитиотрейтол (ДТТ) (Сигма, 10мг/мл) вместо меркаптоэтанола, и переносят в колонку НДС препаративной ячейки (Биорад). После того, как фронт красителя бромфенилового голубого почти достигает нижней части колонки, 24ч отбирают фракции по 2,5мл.

Ингибиторы ферментов. Каждый поставлен фирмой Сигма. Ингибиторы готовят в 20мМ Трис-НСl (рН8) таким образом, что при разбавлении (об/об) получают следующие конечные концентрации: йодацетамид 20мМ, аprotинин 10мкл/мл, пепстатин 2мкг/мл, N-тозил-1-фенилаланин-хлорметилкетон (ТФХК) 50мкг/мл, Na-п-тозил-1-лизин-хлорметилкетон (ТФХК) 50мкг/мл, Na-п-тозил-1-лизин-хлорметилкетон (ТЛХК) 50мкг/мл, этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТК) 2мМ, фенилметилсульфонилфторид (ФМСФ) 1мМ). Ингибиторы добавляют во все фракции. Образцы каждой фракции прогоняют через 5 - 25% гель методом НДС-ПАГЭ и для выявления молекул соответствующей молекулярной массы гель окрашивают серебром. Отобранные фракции концентрируют до 10мл в перемешиваемой ячейке на мембране Амикон UM3. Затем их центрифугируют 30мин при 1°C и 2200об/мин. Надосадочную жидкость отделяют от осадка НДС и диализуют 3 дня относительно 4 перемен 20мМ Трис-буферного солевого раствора, содержащего ингибиторы ферментов (рН7,5).

Подлежащие рассмотрению молекулярные массы были отобраны по молекулярным массам фракций следующим образом: 1. (все молекулы с молекулярной массой ниже 21кД), 2. (23 + 25кД), 3. (30кД), 4. (34кД), 5. (40кД, дублет), 6. (43кД), 7. (все молекулы с молекулярной массой выше 43кД), 8. (смесь всех молекул), 9.

(только адьювант), 10. (образец антигена перед его загрузкой на гель. Образец обработан также центрифугированием на холоду и интенсивным диализом).

Методика иммунизации Каждый антиген представлял собой 10мл надосадочной жидкости. Каждая фракция представляет конкретную - (ые) молекулу (ы) из 5 миллионов онкосфер, в то время как смесь состоит из всех молекул из 2 миллионов, также как и антиген перед загрузкой на гель (группа 10). Для первой инъекции 1мл антигена гомогенизируют с 1мл STM адьюванта (Boknoui и др. Veterinary Immunology and Immunopathology 2, 491 – 500 (1981)., половину животных инъектируют подкожно под левые ребра, а вторую половину инъектируют в левую заднюю ногу. При втором инъектировании состав и путь введения инъекции те же за исключением того, что в каждую инъекцию включают 2мг высушенных замораживанием *Mycobacterium phlci*. Инъектирование проводят с правой стороны.

Контрольное заражение яйцами. Через месяц после повторного инъектирования все ягнята получают перорально по 1000 яиц *E. granulosus*. Яйца хранят 6 недель при 4°C. Яйца извлечены из червей, собранных у экспериментально зараженных собак по методике Heaf D. D. и Lawrence S. B. Ежедневное продуцирование яиц собаками инфицированными *Echinococcus granulosus*, Archivos de la Hidatidosis 30, 321 – 328 (1991).

Экспериментальные животные. Используют ягнят пород Ромн и Дорсет, рассеянных по всем группам. Вырачивают их в условиях, исключающих заражение *E. granulosus* и первую инъекцию получают в возрасте 8 месяцев. Во время первого и второго инъектирования для анализа сыворотки у каждого животного с помощью вакуумного заборника отбирают по 10мл крови, еще раз кровь отбирают после контрольного заражения. Сыворотку отделяют в асептических условиях и хранят при - 20°C до момента испытания культивированкем *in vitro* онкосфер или иммуноблоттированием.

Аутопсия. Через шесть месяцев после контрольного заражения берут еще один образец крови, затем ягнят обескровливают после оглушения пистолетом для оглушения скота. Печень и легкие животных удаляют и в них делают тонкие разрезы для определения числа и состояния присутствующих цист. В печени разрезы делают с интервалом в 2 - 3мм и каждый разрез тщательно исследуют на глаз. В легких разрезы делают с интервалом в 4мм цисты определяют пальпированием, а также осмотром на глаз.

Иммуноблоттирование. Антигены онкосферы *Echinococcus granulosus* разделяют методом НДС-ПАГЭ по опубликованной методике (Laemmli (1970), см. выше) Hames. B. D. и Rickwood. D. Электрофорез белков на геле, практический подход, ИРЛ Пресс, Оксфорд (1981). Образцы солибилизируют кипячением 3мин в 60мМ Трис - HCl (pH6,8), 10% глицерина, 2% НДС, 1% ДТТ и 0,05% бромфенол голубого. Разделение проводят на градиенте геля (T = 5 – 25%) с применением системы вертикального электрофореза (БиоРад, Протеан II) согласно инструкциям изготовителя. Разделенные антигены переносят электрофорезом (Towbin H, Staehelin T. и Gordon J.)

Электрофоретический перенос белков с полиакриламидных гелей на листы нитроцеллюлозы. Методика и некоторые приложения Proceedings of National Academy of Sciences США, 76. 4350 – 4354 (1979) на нитроцеллюлозную бумагу (0,45 мкм, Шляйхер энд Шулл, Дассель, Германия) в охлаждаемой ячейке Трансблот с плоскими электродами (БиоРад, Ричмонд, США.) Перенос осуществляют 2ч при 50 вольт в 10мМ карбонатном буфере (pH9), содержащем 20% метанола (Dunn S. D.). Влияние модификации состава буфера переноса и ренатурирования белков в гелях на распознавание белков моноклональными антителами в вестерн блоттировании Analytical Biochemistry 157, 144 - 153(1986). После переноса нитроцеллюлозные листы помещают в 0,5% Ронсеау, S (BDH) в 1% уксусной кислоте (5мин), после чего ополаскивают дистиллированной водой до момента появления четких полос белка. Маркеры молекулярной массы (Франция) отмечают карандашом. Нитроцеллюлозу, содержащую антиген, нарезают в отдельные полоски и помещают в инкубационные подносы (Шляйхер энд Шулл, Германия) Полоски блокируют 1ч при 37°C добавлением 5% обезжиренного молочного порошка и 0,1% Твин 20 ВДН, растворенные в 20мМ Трис - HCl (pH7,5), 0,5% HCl. Испытуемую сыворотку разбавляют в отношении 1 : 100 блокирующим буфером. Полоски выдерживают в разбавленной сыворотке в течение ночи при комнатной температуре на вращающей платформе. Затем полоски промывают 4 x 10мин с заменой 20мМ Трис - HCl (pH7,5), содержащим 0,5М NaCl и 0,1% Твин 20.

Для трансдифференцировки класса иммуноглобулинов IgG₁ и IgG₂ в иммуноанализ вводят дополнительный этап. После первого антитела полоски зондируют мышинными моноклональными антителами на овечьих IgG₁ или IgG₂, полученными от Др. Keh Beh CSIRO МакМастер Лаборатории, Сидней. Затем полоски зондируют козьим антимышинным IgG (полная молекула), меченным пероксидазой (Каппель) и разбавленным в отношении 1 : 1000 блокирующим буфером. После этого полоски трижды промывают блокирующим буфером без молочного порошка или Твин 20. активность пероксидазы определяют на глаз добавлением 3-амино-9-этилкарбазола (Сигма). Проявление прекращают на всех полосках одновременно, в результате чего может быть проведено сравнение интенсивности окрашивания, отражающей количество специфического иммуноглобулина в каждой сыворотке.

Уничтожение онкосфер *in vitro*. Объединенную сыворотку, полученную перед контрольным заражением, от каждой из 10 групп овец испытывают на способность уничтожать онкосферы.

Для получения комплемента сыворотки плодных ягнят у близких к рождению ягнят стерильным шприцем отбирают кровь, которую сразу же переносят в стерильные полипропиленовые пробирки на 50мл (Фалькон Пластикс). После свертывания 2ч при комнатной температуре сгустки отделяют от стенок стерильными аппликаторными палочками в стерильном кабинете с ламинарным потоком.

Затем пробирки центрифугируют 30мин при 4°C в охлаждаемой центрифуге Бекмана. При удалении сыворотки пробирки держат на льду. Сыворотку плодных телят хранят аликвотами по 2мл при - 70°C, пока они не потребуются. для культивирования.

Культивирование проводят в плоскодонных планшетах для культивирования на 96 лунок (Фалькон, Микротест III). В каждую лунку вносят 150мкл испытуемой сыворотки (дезактивируют 30мин, при 56°C) плюс 150мкл NCTC135, содержащих 50 активированных онкосфер, плюс 20мкл комплемента сыворотки плодных ягнят. Планшеты выдерживают при 37°C в инкубаторе с увлажненным CO₂ и результаты определяют с помощью Лейтц Лабоверт инверсионного микроскопа спустя 24ч и 7 дней. Там, где упомянут NCTC135, в него добавлено 300мг/л гидрохлорида цистеина (Сигма) и 50мкг/мл сульфата гентамицина (Шерлнг).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Характер действия антител против антигена онкосферы, созданного в каждой группе, показан на Фиг.1. Не вызывает сомнений, что различными группами продуцируются антитела, преимущественно распознающие тот интервал молекулярных масс, которыми каждая группа была иммунизирована. В отдельных группах, на пример, группах 1 и 5 в иммунизирующих молекулах имелись эпитопы, разделяемые с эпитопами в молекулах иной молекулярной массы.

Результаты аутопсии приведены в Таблице 1 (группы 1 - 10) показывают, что хотя другие кандидаты антигены и снижают число цист относительно контроля, но только антиген с молекулярной массой в 23 - 25кД создает значительную степень защиты (P = 0,012, P = 10,62,8 DF)

Результаты in vitro уничтожения онкосфер сывороткой групп овец, иммунизированных фракциями различной молекулярной массы, приведены в Таблице 2. Полученные результаты однозначно показывают, что только антиген с молекулярной массой 23 - 25кД из E. granulosus обеспечивает защиту хозяина.

Таблица 1, результаты аутопсии овец, зараженных 1000 яиц E. granulosus после иммунизации нативными антигенами, элюируемыми с полиакриламидных гелей (группы 1 - 8), адъювантом (контрольная группа 9) или НДС обработанными онкосферами (группа 10)

Группа	Иммунизирующий агент	Номер биорок овец	Кол-во цист	Среднее
1	< 20	62, 47, 12, 50, 65	75, 39, 19, 101, 47	56.2
2	23 + 25	05, 24, 67, 45, 95	0, 39, 10, 2, 4	11
3	30	17, 19, 13, 57, 03	0, 42, 17, 148, 197	80.8
4	34	11, 37, 14, 77, 43	167, 9, 48, 85, 126	87
5	40	51, 39, 06, 41, 82	109, 86, 156, 276, 97	144.8
6	43	08, 64, 04, 88, 68	57, 67, 165, 3, 52	68.8
7	> 43	86, 45, 40, 72, 01	84, 75, 2, 17, 78	51.2
8	Смесь	15, 23, 92, 48, 27	0, 0, 104, 133, 79	63.2
9	Контроль	96, 09, 38, 90, 33	27, 137, 170, 242, 86	132.4
10	НДС онкосферы	60, 30, 44, 20, 18	247, 49, 175, 25, 54	110

Таблица 2. In vitro уничтожение онкосфер E. granulosus сывороткой объединенной группы, собранной в день контрольного заражения яйцами E. Granulosus.

№ группы	Обработка	% уничтожения
1	20кД	0%
2	23 - 25кД	91%
3	30кД	0%
4	34кД	0%
5	40кД	0%
6	43кД	0%
7	43кД	0%
8	Смесь всех молекул	0%
9	Только адъювант	0%
10	НДС-онкосферы	0%

ПРИМЕР 2. АФФИННАЯ ОЧИСТКА АНТИТЕЛ-ЗОНДОВ

Аффинно очищенные антитела из иммобилизованной молекулы в 23 - 25кД получают следующим образом. Ягнят 1486 и 1489 четырежды инъектируют подкожно и внутримышечно 100000 активированных онкосфер E. granulosus. Первые две инъекции разделяет две недели, последующую проводят через 1 месяц и затем через 3 месяца. Через неделю после последней инъекции ягням пускают кровь и из 300мл крови в каждом случае получают 150мл стерильной "гипериммунной" антисыворотки. В день отбора сыворотки ягнят заражают 3000 свежесобранных яиц E. granulosus как и двух контрольных ягнят. При аутопсии 6 месяцев спустя иммунизированные ягнята имели цисты только в месте первой инъекции, в то время как контрольные ягнята имели большое количество цист в и печени и легких.

Сыворотка из ягненка 1486 использована для аффинной очистки антител, поскольку обладала более высоким титром способности уничтожать онкосферы. Антитела со специфичностью к антигену онкосферы E. Granulosus, полученному замораживанием-оттаиванием и обработкой ультразвуком, антигену онкосферы полной полосы в НДС-ПАГЭ, антигенам с относительной подвижностью 0 - 20, 20 - 25, 25 - 30, 30 - 36, 36 - 37кД или к антигенам, с относительной подвижностью 0 - 20, 20 - 30, 30 - 43, 43 - 67, 67 - 90 90 - 180 и > 180кД подвергают аффинной очистки - с полосок нитроцеллюлозы, содержащих указанные антигены. Очистку проводят по методике Beall J. A., и M. Lchell. G. F. Идентификация конкретного антигена из кДНК библиотеки

паразита применением антител, полученных аффинной очисткой из выбранных частей вестерн блотов Journal of Immunological Methods 86, 217 – 223 (1986). Белком-носителем служит 1% сыворотка плодного ягненка. Аффинно очищенные антитела промывают и затем применением перемешиваемой ячейки Амикон и, мембраны PM10 концентрируют в 10 раз.

ПРИМЕР 3. КЛОНИРОВАНИЕ И ЭКСПРЕССИЯ РЕКОМБИНАНТНОЙ ДНК АНТИГЕНОВ ОНКОСФЕРЫ ECINOCOCCUS GRAANOLUSUS.

1. Выделение и проверка мРНК.

(а) Подготовка реактивов.

Все растворы, используемые при выделении и обработке мРНК, за исключением растворов, содержащих Трис/Трис (гидроксиметил) аминотетан, Сигма, Сан-Луи, МО, СМ) обрабатывают в течение ночи 0,1% диэтилпиноксикарбоната (ДЭПК, Сигма) и перед употреблением выдерживают в автоклаве. Всю стеклянную посуду прокалывают в течение ночи при температуре 200°C или выше. Общие растворы Трис получают в воде, обработанной ДЭПК и в автоклаве.

(в) Онкосферы

Зрелые яйца *E. granulosus* получают и активируют прорклевыванием по методике, подробно изложенной в примере 1. Примерно 4×10^6 онкосфер, солибилизируют на льду в безнуклеазном, 6М гидрохлориде гуанидина (BRL ультраточный. Бетесда Рисерч Лабораториз, США), 0,1М ацетате натрия с помощью тканевого гомогенизатора из стекла и тефлона. Солибализированные онкосферы перед выделением РНК хранят при -70°C.

(с) Выделение РНК

Солибализированные онкосферы оттаивают на льду и нерастворимые вещества осаждают центрифугированием 30 минут при 4°C и 10000об/мин в роторе типа 50Т, и ультрацентрифуге Бекман I 8 (Бекман, Пало, Альто, СА, США). Надосадочную жидкость наспивают над раствором, содержащим 4,8М хлорида цезия (CsCl, BRL ультраточный, Бетесда Рисерч Лабораториз, Гайтерсбург, МД, США) 10мМ ЭДТК (этилендиамминтетрауксусная кислота, динатриевая соль) в количестве 6,5мл гуанидина/5,5мл CsCl на полналломерную пробирку для ротора Бекман SW40. Пробирки центрифугируют 18ч при 15°C и 35000об/мин в SW40 роторе, ультрацентрифуге Бекман L8. Надосадочную жидкость отбрасывают, а основание пробирки быстро и осторожно ополаскивают 200мкл $T_{10}E_1$ (10мМ Трис, 1мМ ЭДТК, pH8). Осажденную РНК растворяют в 200мкл $T_{10}E_1$ и вновь осаждают давлением 1 : 10 объема 3М ацетата натрия и 2,5 объема охлажденного льдом 100%-го этанола, после чего выдерживают в течение ночи при 20°C. Осажденную РНК центрифугируют 15 минут при 4°C в микроцентрифуге, осадок ополаскивают 70%-ым этанолом, центрифугирование повторяют и конечный осадок сушат на воздухе. Затем РНК суспендируют в 50мкл $T_{10}E_1$, и ее количество, определенное по поглощению при длине волны 260нм, составляет 23мкг общей РНК. Один микрограмм анализируют на 1,2% формальдегид-агарозном геле (Sambrook J. Fritschee E. P., Maniatis). Молекулярное клонирование лабораторное руководство, Коулд Спринг Харбор Лаборатори Пресс (1989) и находят, что РНК включает интактную рибосомную РНК.

(о) Очистка поли-А⁺ РНК

Поли-А⁺ матричную РНК очищают на олиго(dT)-целлюлозе типа 7 (Фармация ЛКБ Биотехнологии, Уппсала, Швеция) согласно инструкциям изготовителя, но особенно по методике Aviv H. Leder P. Очистка биологически активной матричной РНК глобина хроматографией на олиготимидильной кислотной целлюлозе, Proc. Natl. Acad. Sci 69, 1408 – 1412 (1972). Элюируемую поли-А⁺ мРНК осаждают вышеприведенным способом и оса док вновь растворяют в 50мкл $T_{10}E_1$.

(е) Трансляция in vitro

мРНК аликвотой в 5мкл транслируют in vitro использованием лизата кроличьих ретикулоцитов (Amersham Англия) согласно инструкциям изготовителя в полном реакционном объеме в 25мкл. Продукт радиометят применением 37,5мкCi ^{35}S -метионина (Amersham Интернейшнл, Amersham Англия) и исследуют электрофорезом на полиакриламидном геле в 10%-ном акриламидном геле в восстановительных условиях (Laemmli: U. K.) Расщепление структурных белков в ходе сборки головки бактериофага T4, Nature 227, 680 – 685 (1970) с детектированием флюорографией с последующей пропиткой геля Амплифай (Amersham Англия). Продукты трансляции были обильными и самыми разнообразными по размеру, включая продукты с молекулярной массой более 94кД.

2. Синтез - и клонирование кДНК

(а) Синтез кДНК

Тридцать семь микролитров раствора мРНК в $T_{10}E_1$ подвергают обратной транскрипции в присутствии $L^{32}P$ -дАТФ (Amersham) с применением обратной транскриптазы вируса мышиной лейкемии Молони, а также реактивов и инструкции, прилагаемых к набору синтеза кДНК ZAP (Лот №UC206, каталожный №200400, Стратаген, Дюлль, США), после синтеза второй цепи аликвотное количество анализируют электрофорезом на 1% щелочном агарозном геле согласно инструкции, прилагаемой к набору синтеза кДНК 2ZAP. кДНК была неоднородной по размеру, и при сравнении с лямбда - HindIII ДНК маркерами (Промега Корпорейшн, Медисон, WI, США) включала поддающиеся обнаружению транскрипту в более, чем 2000п. о.

(в) Клонирование кДНК.

кДНК клонируют в бактериофаговый вектор Uni-ZAPXR (λ ZAP) (Стратаген) в условиях, подробно изложенных в инструкции изготовителя набора для клонирования UNI-ZAPXR (Лот №18, каталожный №237211, Стратаген). кДНК лигируют с вектором без какого-либо отбора кДНК по размеру. Образец кДНК полностью лигируют с 1мкг

векторной ДНК.

(с) Упаковка in vitro бактериофага

Два микролитра лигированной с вектором кДНК упаковывают в инфекционный фаг применением единственной упаковочной реакции из Gigapack II Gold (Лот №1535, каталожный №200216, Стратаген) согласно инструкциям изготовителя. Полученный фагтитруют на *E. coli* PLLKK-F'. Остальную лигированную кДНК затем упаковывают в двух равнозначных реакциях, продукты трех реакций объединяют и титруют. Полученную библиотеку кДНК клонов (кДНК библиотека) в ZAP титруют в PLK-F, и согласно анализу библиотека содержит примерно 100000 первичных клонов (методика приведена в инструкции к набору для копирования UNI-ZAPXR, Стратаген)

3. Амплификация кДНК библиотеки

Библиотеку кДНК целиком амплифицируют на клетках *E. coli* PLLKK-F' при плотности 5000 бляшко-образующих единиц (БОЕ) на пластинку агара диаметром 150мм. Амплифицированный фаг собирают в течение ночи в 10мл SM (100мм NaCl, 8мм MgSO₄, 50мм Трис (pH7,5), 0,01% мас/об желатина). Амплифицированную библиотеку объединяют и титруют на клетках *E. coli* XLI-Голубой (Стратаген) в присутствии изопропилтиогалактозида (ИПТГ) и 5-бром-4-хлор-3-индолил-β-D-галактозида (ХоАI) согласно инструкции к набору для клонирования IIII-APXP (Стратаген)

4. Иммуноскрининг кДНК библиотеки

(а) Приготовление антител-зондов

В иммуноанализе бляшек использовано два типа антител-зондов; сывороточных и аффинно очищенных антител, полученных по методике примера 2. Сывороточные образцы объединяют от "фоновой" реакционной способности к *E. coli* и/или β-галактозидазе следующим образом. Нереккомбинантный λgIII или λZAP наносят почти конфлюэнтно на приемлемый штамм *E. coli* (как правило, XLI-I, Стратаген). Нитроцеллюлозные фильтры (Шляйхер энд Шуелл, Дассель, Германия) пропитывают 10мм ИПТГ, сушат и после инкубирования пластинок 4 часа при 42°C поверх каждой стороны пластинки накладывают по одному фильтру. Затем пластинки выдерживают в течение ночи при 37°C к еще 36мин при 4°C. Фильтры удаляют и ополаскивают TNT (150мм NaCl, 0,05% Твин 20, 10мм Трис, pH8) и инкубируют в 5% обезжиренного молочного порошка/TNT (BLOTTO) 1час. Все операции инкубирования в иммуноанализе проводят при комнатной температуре (КТ°) на вращающейся платформе. Каждый применяемый в иммуноанализе образец разбавляют TNT плюс 20% сыворотки плодного теленка (FTNT) и инкубируют в чашке Петри, содержащей 20мл разбавленной сыворотки плюс два нитроцеллюлозных фильтра, приготовленных вышеописанным способом. После инкубирования 2ч нитроцеллюлозные фильтры удаляют, и аффинно обедненная сыворотка готова к применению в иммуноанализе бляшек.

Антитела-зонды, полученные из сыворотки аффинной очисткой (подробности см. пример 2), не подвергают аффинному обеднению с нереккомбинантными λgIII или λZAP и в иммуноанализе их применяют без разбавления.

(в) Иммуноанализ клонов кДНК библиотеки

В первичном скрининге амплифицированной кДНК библиотеки используют два источника антител. Сыворотку овцы 1486, полученную по методике примера 2, готовят вышеприведенным способом и применяют для выявления кДНК клонов, экспрессирующих антигены онкосферы *E. granulosus*. кДНК библиотеку наносят на пластинки и подвергают иммуноанализу по стандартным методикам, приведенным в работе Sambrook и др. (см. выше). Вкратце. Бляшки наносят в чашках Петри диаметром 150мм в количестве 5000БОЕ на пластинку LG агарозы и NZY поверхностного агара (0,9% агара). Применяют BB4 и XLI Голубой штаммы *E. coli* (Стратаген). Клоны, связывающие антитела в испытуемой сыворотке, обнаруживают с помощью кроличьего антиовечьего IgG (тяжелая и легкая цепь), конъюгированного с щелочной фосфатазой (каталожный №313055003, Джексон Иммуно Рисерч Лабораторна, Вест Гроув, США). Конъюгат антител разбавляют в отношении 1 : 2000 в BLOTTO и инкубируют в количестве 5мл на фильтр, каждый фильтр по отдельности по 2ч. Затем фильтры промывают по отдельности шестью переменаами TNT в течение 1ч со вращением между переменаами. Положительные бляшки обнаруживают с помощью бромхлориндолилфосфата/нитроглубого тетразолия (БХИФ/НГТ) в качестве хромогенного субстрата по методике Hariow E., Lane D., Антитела, лабораторное руководство, Коулд Спринг Харбор Лаборатори Пресс (1988). В общей сложности бляшки 129 клонов идентифицированы, как дающие предположительно положительные сигналы с сывороткой. Каждую такую бляшку снимают с пластинки агара стерильной пастеровской пипеткой и переносят в 0,5мл SM. SM надосадочную жидность от каждого клона, содержащую пассивно элюируемый клон бактериофага, титруют по стандартной методике (Sambrook и др., см. выше) и подвергают повторному скринингу на пластинках диаметром 75мм и фильтрах при низкой плотности (установочные 50 бляшек на пластинку). Из 129 исходных клонов для 80 подтверждена положительная реакция, проведенная вышеописанным способом с сывороткой овцы 1486.

Аналогичным образом библиотеку подвергают скринингу с антителами, полученными аффинной очисткой по методике примера 2 от овцы 1486. Единственный положительный клон выявлен для фракции 2 сыворотки (соответствует антителам к антигенам онкосферы в 20 - 25кД), который обозначен, как клон S2, и один клон собран, как реагирующий с фракцией 3 сыворотки (антигены з 25 - 30кД), и обозначен клоном S3. Для обоих клонов подтверждена положительность во вторичном иммуноанализе, приведенном выше.

Каждый клон фага нанесен на единственную пластинку диаметром 150мм с плотностью 20000БОЕ/пластинку и общее количество фага собирают способом, приведенным выше для амплификации библиотеки.

(с) Отбор клонов

Из библиотеки клонов на основе результатов иммуноанализа клоны S2, S3, 48, 95, 101, 119 и 123 отобраны для дальнейших испытаний на предмет выявления, способны ли экспрессируемые ими антигены защитить хозяина. Клоны 33, 42 и 86 (для которых предшествующими не сообщенными исследованиями заявителей установлена неспособность создать статистически значимую защиту) также отобраны для использования в качестве контрольных.

5. Субклонирование и экспрессия кДНК

(а) Получение рBluescript

Плаزمида рBluescript создана с помощью флагмидного помощника из λ ZAP общего образца, отобранного для каждого кДНК клона согласно инструкции изготовителя, прилагаемой к набору для клонирования UNII-ZAPPRX (Стратаген).

(в) Субклонирование в рСЕХ-3ЕХ

Векторной системой, выбранной для экспрессии антигенов *E. granulosus* с целью испытания вакцины, служат плазмиды серии рGEX (АМРАД Корпорейшн, Мельбурн, Австралия), экспрессирующие кодируемую паразитом часть молекулы в виде слитого белка у карбоксильного конца *Schistosoma japonicum* глутатион-S-трансферазы (Smith D. B. Johnson K. S.). Очистка в одну стадию полипептидов, экспрессируемых в *Escherichia coli* в виде слитых белков с глутатион-S-трансферазой, Сене 67, 31 - 40 (1988)). Чтобы иметь возможность субклонировать непосредственно клонируемые кДНК из λ ZAPXR вектора, было необходимо модифицировать рСЕХ3Х вектор с целью вставки X_{ho} I сайта рестрикции в нисходящем направлении от Eco RI сайта рестрикции в рGEX полилинкере. Это было достигнуто вставкой ренатурированных олигонуклеотидов, имеющих следующую последовательность:

5'AATTCATACTCCACT3'

3'CTATCACCTCATTA5'

Помимо введения X_{ho} I сайта данный конструктор сохраняет однонаправленное планирование кДНК, созданное в λ ZAPXR - векторе. Модифицированный вектор получил обозначение рСЕХ3ЕХ. При модификации рGEX вектора использованы обычные методики, подробно описанные у Sambrook и др. (см. выше). Если вкратце, то ренатурированные олигонуклеотиды обрабатывают Т4. Полинуклеотид-киназой (Нью Ингленд Биолэбз, Беверли, КА, США); рGEX3ХДНК гидролизуют в присутствии Eco RI (Нью Ингленд Биолэбз), фосфатизируют и лигируют с обработанными киназой ренатурированными олигонуклеотидами. Применением кальцийхлоридного метода *E. coli* JM101 трансформируют лигированной плазмидой. Отбирают трансформированные плазмидой бактериальные клоны, выделяют плазмидную ДНК и модификацию подтверждают секвенированием соответствующего участка ДНК методом дидеокситерминации цепи после субклонирования в бактериофаг M13 Bam HI (положение 914)/PstI (положение 1885). рGEX3ЕХ вектор имеет следующую ДНК-последовательность и предсказанную трансляционную аминокислотную последовательность в области полилинкера:

рGEX-3ЕХ	CCA AAA TCG GAT CTG ATC GAA GGT CGT GGG ATC	<u>BamHI</u>
	Pro Lys Ser Asp Leu Ile Glu Gly Arg Gly Ile	
	<u>SmaI</u>	Фактор X
	<u>EcoRI</u>	
	CCC GGG AAT TCA TAC TCG AGT AAT TCA TCG TGA	
	Pro Gly Asn Ser Tyr Ser Ser Asn Ser Ser ***	

ДНК плазмиды Pbluescript очищают от центрифугированием в CsCl (Sambrook и др., см. выше) и вставку кДНК вырезают следующим образом. Примерно 2мкг каждого клона рBluescript ДНК гидролизуют в присутствии по 10 единиц каждой из EcoRI и X_{ho} I (Амерсхам, Англия) в 20мкл высоко солевого буфера. Вставку ДНК очищают в 1% агарозы, полосы ДНК вырезают и очищают с помощью Генеклина (БИО101 Инк., Ла Джолла, США). После количественного определения по поглощению при 260нм примерно 100нг вставки ДНК лигируют (2 единицы Т4 ДНК-лигазы, Бозрингер, Маннгейм) с примерно 50нг очищенного в CsCl, фосфатизированного продукта гидролиза рСЕХ-3ЕХ ДНК в присутствии обоих EcoRI и X_{ho} I.

Лигированной рСЕХ-3ЕХ кДНК (см. ниже) трансформируют *E. coli* штамм ВВ4 (Стратаген Клонинг системе, Ла Джолла, Калифорния, США каталожный №200259) электропорацией с применением генного пульсатора фирмы БиоРад согласно инструкции изготовителя (БиоРад, Ричмонд, США).

ПРИМЕР 4. ПРОДУЦИРОВАНИЕ СЛИТОГО БЕЛКА *E. GRANULOSUS*.

Отобранные клоны кДНК онкосферы *E. granulosus* субклонировать в экспрессионную плазмиду рСЕХ-3ЕХ и трансформируют *E. coli* штамм ВВ4 вышеприведенным способом.

Экспрессией получают белок паразита, слитый с глутатион-S-трансферазой (ГСТ). Такие слитые белки часто растворимы, что позволяет выделять их из лизированных клеток в неденатурирующих условиях путем абсорбции шариками глутатион-агарозы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.

GST слитый белок индуцируют и очищают по существу применением методики Smith и Johnson, Gene 67, 31 - 40 (1988) использованием характерных стадий, подробно изложенных ниже.

1. Колонией рСЕХ трансформанта инкубируют 4 x 100мл LB/ампициллин среды, инкубируют в течение ночи при 37°C во встряхиваемом инкубаторе.

2. Культуры разбавляют в отношении 1 : 10 свежей LB/ампициллин средой и инкубируют 90мин при 30°C.

3. Добавлением 100мМ ИПТГ до концентрации 0,1мМ индуцируют экспрессию.

4. Инкубирование продолжают еще 4,5 часа.

5. Клетки собирают центрифугированием при 5000 x g, 4°C, 10мин.

6. Клеточный осадок от каждого 1 литра вновь суспендируют 15мл холодного ФБС и хранят при - 20°C / -

70°C, пока не потребуется.

7. Осадок оттаивают, добавляют лизозим до концентрации 0,25мг/мл и инкубируют 10мин при комнатной температуре.

8. Добавляют Тритон X-100 до концентрации 0,5%.

9. Клеточную суспензию обрабатывают на льду ультразвуком 3 x 12сек импульсами с перерывами в 15сек.

10. Нерастворимые вещества удаляют центрифугированием при 10000 x g, 4°C, 15мин.

11. Надосадочную жидкость от 1 литра исходного продукта добавляют к 15мл 50% шариков глутатион-агарозы и осторожно перемешивают 3 часа при комнатной температуре.

12. Шарик агарозы осаждают центрифугированием при 2000g, 5мин при комнатной температуре.

14. Шарик агарозы промывают 5 раз с равным объемом холодного ФБС и центрифугированием при 2000g, 5мин, комнатная температура.

14. Выделяют связанный с агарозой GST слитый белок.

15. Концентрацию слитого белка на шариках агарозы определяют белковым анализом Брэдфорда (Биорад).

ПРИМЕР 5. ДЕМОНСТРАЦИЯ ИММУНОГЕННОСТИ E. GRANULOSUS СЛИТОГО БЕЛКА.

Овцы во время первой вакцинации достигали возраста 8 месяцев, и вскармливались на пастбищах, свободных от яиц E. granulosus. В экспериментах применялись овцы пород Ромни и Дорсет, которые рассеивались в 9 группах из 5 вакцинированных овец и 1 контрольной группы из 8 овец. Каждому животному вводилось 50мкг связанного с агарозой слитого белка (полученного по методике примера 4) в смеси (1 : 1) солевого раствора: ТА адъюванта (Bokhout B. A., van Gaalen C. Van der Heijden Ph. J.). Подобранный эмульсия типа вода в масле. Состав и применение в качестве иммунологического адъюванта, Veterinary Immunology and Immunopathology 2, 491 - 500 (1981). Полный объем инъекции в 2мл/овцу вводят половине животных подкожно, а другой половине - внутримышечно, в обоих случаях с левой стороны. Через месяц инъектирование повторяют с правой стороны. Контрольным животным вводят экспрессированную глутатион-трансферазу из pCEX.

Через две недели после второй инъекции у овец берут кровь и готовят сыворотку для культивирования in vitro и для иммублотирования антигена онкосферы по методике примера 1. В тот же день овец заражают 1000 яйцами E. granulosus перорально (см. пример 1).

АУТОПСИЯ

Через шесть месяцев после заражения овец обескровливают после оглушения пистолетом для оглашения скота, легкие и печень удаляют для исследования. В печени с интервалом в 2мм делают надрезы и тщательно на глаз определяют наличие цист, в легких надрезы делают с интервалом в 4мм и для определения присутствия цист надрезы пальпируют. В сомнительных случаях надрезы вскрывают для подтверждения присутствия в них цист E. granulosus.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Результаты аутопсии приведены в таблице 3, в таблице 4 приведены результаты уничтожения онкосфер in vitro. Значительную степень иммунитета на контрольное заражение стимулирует клон S2 (97%, P ; 0,001, F = 24,04, IIDГ), клон 48 (83%, P = 0,002, F = 16,51, NDГ), клон 95 (96%, P < 0,001, F = 23,41, NDГ), клон 119 (83%, P = 0,002, IIDГ).

Уничтожение in vitro онкосфер наблюдается только в объединенной сыворотке от этих четырех клонов и в случае смеси всех клонов.

Все эти клоны продуцируют антитела, реагирующие с нативным антигеном в 23 - 25кД, а два клона (101 и 123), не индуцирующие статистически значимую защиту, реагируют с нативной молекулой в 34кД. Другой клон, не индуцирующий статистически значимую защиту (S3), реагирует с молекулой з 30кД (Фиг. 2).

Оба клона S2 и 95 индуцируют сильную IgG₂ реакцию на молекулу в 23 - 25кД по сравнению с менее эффективными клонами 48 и 119. Отдельные овцы в этих группах из пяти овец также усиливают гипотезу о том, что сильная IgG₂ реакция способствует в индуцировании защитной иммунности (Фиг.3).

Небольшие отклонения в результатах для 10 овец, иммунизированных клоном S2 или 95, указывает на то, что данная последовательность может распознаваться широким спектром фенотипов.

Таблица 3					
Результаты аутопсии овец, зараженных яйцами E. Granulosus после иммунизации рекомбинантными анти-генами					
Группа	Иммунизирующий антиген	Номера бирок овец	Кол-во цист	Среднее	
11	Клон S2	28, 53, 46, 29, 16	2, 3, 0, 16, 3	4.8	
12	Клон S3	56, 54, 36, 26, 71	0, 68, 72, 53, 99	58.4	
13	Клон 48	31, 49, 25, 22, 66	17, 58, 12, 0, 46	26.6	
14	Клон 95	76, 80, 10, 42, 52	13, 14, 5, 0, 2	6.8	
15	Клон 101	58, 02, 93, 79, 83	64, 79, 30, 108, 100	76.2	
16	Клон 119	84, 73, 91, 85, 55	53, 29, 0, 13, 40	27	
17	Клон 123	21, 07, 34, 81, 63	305, 8, 100, 20, 40	94.6	
18	Смесь 7 клонов MIX of 7 CLONES	89, 61, 75, 74, 70	8, 74, 27, 0, 105	42.8	
19	Клоны 33, 42, 86""	32, 87, 69, 78, 59	6, 130, 136, 5, 200	95.4	
20	ГСТ-Контроль	94, 97, 99, 00, 01, 02, 04, 05	70, 105, 270, 180, 122, 227, 108, 171	156.6	

Таблица 4	
Уничтожение in vitro онкосфер E. granulosus сывороткой объединенной группы, собранной в день контрольного заражения яйцами E. granulosus	

№ группы	Обработка	% уничтожения
11	Клон 2	94%
12	Клон 3	0%
13	Клон 48	97%
14	Клон 95	100%
15	Клон 101	0%
16	Клон 119	89%
17	Клон 123	0%
18	Смесь всех клонов	89%
19	Смесь клонов 33, 42, 86	0%
20	Адьювант (контроль)	0%
21	Контрольные онкосферы	0%

ПРИМЕР 6. ЧАСТИЧНОЕ ДНК СЕКВЕНИРОВАНИЕ КЛОНОВ S3, 48, 95, 119

Получение pBluescript

Фагмидная pBluescript создана с помощью фагмидного помощника из лямбда-Zap, общего для каждой кДНК согласно инструкции набора для клонирования UNI-ZAPXR (Стратаген).

Получение одноцепочечной ДНК

Однацепочечная ДНК получена из плазмиды pBluescript (Стратаген) по методике Ausabel и др. Ред. "Современные методы молекулярной биологии", Грин Паблишинг Ассошиэйт энд Вили Нтерсайенс, Нью-Йорк (1987).

Секвенирование кДНК

кДНК частично секвенируют терминацией цепи (Sanger F. Nicklen S. Coullaonn Aa. R.). Секвенирование ДНК ингибиторами терминации цепи, Proc. Nall. Acad. Sci., США 14, 5463 (1977) применением секвеназы, вариант 2 (Юнайтид Стейтс Биокемикл). Праймером служит Т4 (Альберт Энштейн Колидж оф Медисайн, отдел синтеза олигонуклеотидов). Продукты реакций терминации разделяют на 6% полиакриламидном геле и оценивают визуально автораддиографией (Х - Омат, Кодак).

Результаты

Результаты представлены в таблице 5.

Таблица 5			
Название: 95	Длина: 224	Контроль: 7088	Масса: 1,00
Название: 2	Длина: 224	Контроль: 7088	Масса: 1,00
Название: 48	Длина: 224	Контроль: 7088	Масса: 1,00
Название: 119	Длина: 224	Контроль: 7088	Масса: 1,00

1	59
95	TCCAGTAT GTCTCATTT GTTTCGACT TCACTTTGG CTCAGGAATA CAAAGGAATG
S2	TCCAGTAT GTCTCATTT GTTTCGACT TCACTTTGG CTCAGGAATA CAAAGGAATG
48	GTCTCATTT GTTTCGACT TCACTTTGG CTCAGGAATA CAAAGGAATG
119	GTCTCATTT GTTTCGACT TCACTTTGG CTCAGGAATA CAAAGGAATG
60	109
95	GGCGTAGAGA CAAGGACAAC AGAGACTCCG CTCGTAAC ACTTCAATT
S2	GGCGTAGAGA CAAGGACAAC AGAGACTCCG CTCGTAAC ACTTCAATT
48	GGCGTAGAGA CAAGGACAAC AGAGACTCCG CTCGTAAC ACTTCAATT
119	GGCGTAGAGA CAAGGACAAC AGAGACTCCG CTCGTAAC ACTTCAATT
110	159
95	GACTCCTGTG GGTTCCTAGG GCATTCGCTT AAGTTGGGAA GTCCAACACT
S2	GACTCCTGTG GGTTCCTAGG GCATTCGCTT AAGTTGGGAA GTCCAACACT
48	GACTCCTGTG GGTTCCTAGG GCATTCGCTT AAGTTGGGAA GTCCAACACT
119	GACTCCTGTG GGTTCCTAGG GCATTCGCTT AAGTTGGGAA GTCCAACACT
160	209
95	TGTCTGACCT CAAAGGAACA GATAATTCT TAAAGCGGT GAATCCTCT
S2	TGTCTGACCT CAAAGGAACA GATAATTCT TAAAGCGGT GAATCCTCT
48	TGTCTGACCT CAAAGGAACA GATAATTCT TAAAGCGGT GAATCCTCT
119	TGTCTGACCT CAAAGGAACA GATAATTCT TAAAGCGGT GAATCCTCT
210	233
95	GACCCGTTAG TCTACAAAAG ACAA
S2	GACCCGTTAG TCTACAAAAG ACAA
48	GACCCGTTAG TCTACAAAAG ACAA
119	GACCCGTTAG TCTACAAAAG ACAA

Как видно из таблицы 5, каждый клон, для которого показана способность экспрессировать защитные антигены против E. granulosus включает идентичную молекулу ДНК в 224 п. о. (вышеприведенные нуклеотиды 10 - 233).

ПРИМЕР 7. ПРИМЕР СЕКВЕНИРОВАНИЕ КЛОНА 95

кДНК секвенируют с помощью Т7 Секвенсинг-набора (Фармация) с применением C₃SCI - очищенной плазмидной ДНК и олигонуклеотидных праймеров, происходящих рСЕХ последовательности в примерно 30п. о. в восходящем и нисходящем направлении от Eco RI сайта клонирования. Олигонуклеотиды приготовлены использованием PCR-МАТЕ391 ДНК синтезатора (Эпплайд Биосистемс, Шостер Сити, КА. США) и химикатов фирмы Эпплайд Биосистемс. Внутренняя последовательность получена применением прямых и обратных

олигонуклеотидных праймеров, выявленных из внутренней кДНК-последовательности.

Полная последовательность клона 95 и предсказанная аминокислотная последовательность трансляционного белка приведены на Фиг.4. кДНК клона 95 включает вставку в 715п. о. (не включает нуклеотиды, появившиеся, как часть стратегии клонирования в λ ZAP). Данная кДНК содержит открытую рамку считывания в 461п. о., кодирующую предсказанный белок с молекулярной массой 16592Да.

Следующая ДНК-последовательность включена в полную последовательность клона 95, и ее происхождение определяется стратегией, применяемой при получении кДНК и клонирования в λ ZAPXR вектор.

У 5' - конца кДНК:

5'CAATTCCCCACCAC3'

у 3' - конца кДНК:

5'AAAAAAAAAAAAAAAAAACTCCAC3'

Последователь с Фиг.4 независимо подтверждена применением методики примера 6.

ПРОМЫШЛЕННОЕ ПРИМЕНЕНИЕ.

Согласно настоящему изобретению дается антигенный полипептид, а также активные пептидные фрагменты и варианты такого полипептида, эффективно создающие защитную иммунологическую реакцию на инфицирование *E. granulosus* у восприимчивого хозяина. Установлено, что вакцинация данным полипептидом и/или его пептидными фрагментами создает почти полную иммунность против контрольного заражения яйцами *E. granulosus*. Изобретением дается биотехнологический способ экспрессирования антигена, которым тот может быть получен в промышленных количествах.

Необходимо подчеркнуть, что вышеприведенное описание дается всего лишь в качестве примера и что могут иметь место вариации, как в применяемых материалах, так и в технологии, известные специалистам.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

(2) информация для последовательности №1:

(1) Характеристики последовательности

(A) Длина: 224 пары оснований

(B) Тип: нуклеиновая кислота

(C) Число цепей: одна

(D) Топология: линейная

(2) Молекулярный тип: кДНК

(3) Описание последовательности: последовательность №1:

1 GT CTC ATT TTG TTT GCG ACT TCA GTT TTG GCT CAG GAA TAC AAA GGA 47
Leu Ile Leu Phe Ala Thr Ser Val Leu Ala Gln Glu Tyr Lys Gly

48 ATG GGC CTA GAG ACA AGG ACA ACA GAG ACT CCG CTC CGT AAA CAC 92
Met Gly Val Glu Thr Arg Thr Thr Glu Thr Pro Leu Arg Lys His

93 TTC AAT TTG ACT CCT GTG GGT TCT CAG GGC ATT CGC TTA AGT TGG 137
Phe Asn Leu Thr Pro Val Gly Ser Gln Gly Ile Arg Leu Ser Trp

138 GAA GTC CAA CAC TTG TCT GAC CTC AAA GGA ACA GAT ATT TCT CTA 182
Glu Val Gln His Leu Ser Asp Leu Lys Gly Thr Asp Ile Ser Leu

183 AAA GCG GTG AAT CCT TCT GAC CCG TTA GTC TAC AAA AGA CAA 224
Lys Ala Val Asn Pro Ser Asp Pro Leu Val Tyr Lys Arg Gln

(3) Информация для последовательности №3:

(1) Характеристики последовательности:

(A) Длина: 74 аминокислоты

(B) Тип: аминокислота

(C) Топология: линейная

(2) Молекулярный тип: белок

(3) Описание последовательности: последовательность №2:

1 Leu Ile Leu Phe Ala Thr Ser Val Leu Ala Gln Glu Tyr Lys Gly 15

16 Met Gly Val Glu Thr Arg Thr Thr Glu Thr Pro Leu Arg Lys His 30

31 Phe Asn Leu Thr Pro Val Gly Ser Gln Gly Ile Arg Leu Ser Trp 45

46 Glu Val Gln His Leu Ser Asp Leu Lys Gly Thr Asp Ile Ser Leu 60

61 Lys Ala Val Asn Pro Ser Asp Pro Leu Val Tyr Lys Arg Gln 74

(4) Информация для последовательности №3:

(1) Характеристики последовательности:

(A) Длина: 715 пар оснований:

(B) Тип: нуклеиновая кислота

(C) Число цепочек: одна

(D) Топология: линейная

(2) Молекулярный тип: кДНК

(3) Описание последовательности: последовательность №3:

```
1 TC CAG TTA TGT CTC ATT TTG TTT GCG ACT TCA GTT TTG GCT CAG GAA 47
  Gln Leu Cys Leu Ile Leu Phe Ala Thr Ser Val Leu Ala Gln Glu

48 TAC AAA GGA ATG GGC GTA GAG ACA AGG ACA ACA GAG ACT CCG CTC 92
  Tyr Lys Gly Met Gly Val Glu Thr Arg Thr Thr Glu Thr Pro Leu

93 CGT AAA CAC TTC AAT TTG ACT CCT GTG GGT TCT CAG GGC ATT CGC 137
  Arg Lys His Phe Asn Leu Thr Pro Val Gly Ser Gln Gly Ile Arg

138 TTA AGT TGG GAA GTC CAA CAC TTG TCT GAC CTC AAA GGA ACA GAT 182
  Leu Ser Trp Glu Val Gln His Leu Ser Asp Leu Lys Gly Thr Asp

183 ATT TCT CTA AAA GCG GTG AAT CCT TCT GAC CCG TTA GTC TAC AAA 227
  Ile Ser Leu Lys Ala Val Asn Pro Ser Asp Pro Leu Val Tyr Lys

228 AGA CAA ACT GCA AAA TTC TCA GAT GGA CAA CTC ACT ATC GGC GAA 272
  Arg Gln Thr Ala Lys Phe Ser Asp Gly Gln Leu Thr Ile Gly Glu

273 CTG AAG CCC TCC ACA TTA TAC AAA ATG ACT GTG GAA GCA GTG AAA 317
  Leu Lys Pro Ser Thr Leu Tyr Lys Met Thr Val Glu Ala Val Lys

318 GCG AAA AAG ACC ATT TTG GGA TTC ACC GTA GAC ATT GAG ACA CCG 362
  Ala Lys Lys Thr Ile Leu Gly Phe Thr Val Asp Ile Glu Thr Pro

363 CGC GCT GGC AAG AAG GAA AGC ACT GTA ATG ACT AGT GGA TCC GCC 407
  Arg Ala Gly Lys Lys Glu Ser Thr Val Met Thr Ser Gly Ser Ala

408 TTA ACA TCC GCA ATC GCT GGT TTT GTA TTC AGC TGC ATA GTG GTT 452
  Leu Thr Ser Ala Ile Ala Gly Phe Val Phe Ser Cys Ile Val Val

453 GTC CTT ACT TGA ACT CTC ATG TAA GTC AAT GCA AAT TAT CCA CTG 497
  Val Leu Thr

498 CTT CTA TAC TGA GTA GCA CGA CCC ATA ACT TGC ATT TTT CAA ATA 542

543 ACT CTT CTT CCA CAT CAG GCT TCC TTG GTG CCG AAG ATG CAC AAA 587

588 TCA CCA TTT ATT TTC GCT TTA TTA ACA TTT GTA TGA CCT CTC ATT 632

633 GTG GAT TAC TCC CGA ATG ACA AAT ACG GGA CTT TGT CAT ATT TGC 677

678 TTC ATT GTT ATC ACC CTT AAT TCC AAT TCA CTG ACT CG 715
```

(5) Информация для последовательности №4:

(1) Характеристики последовательности:

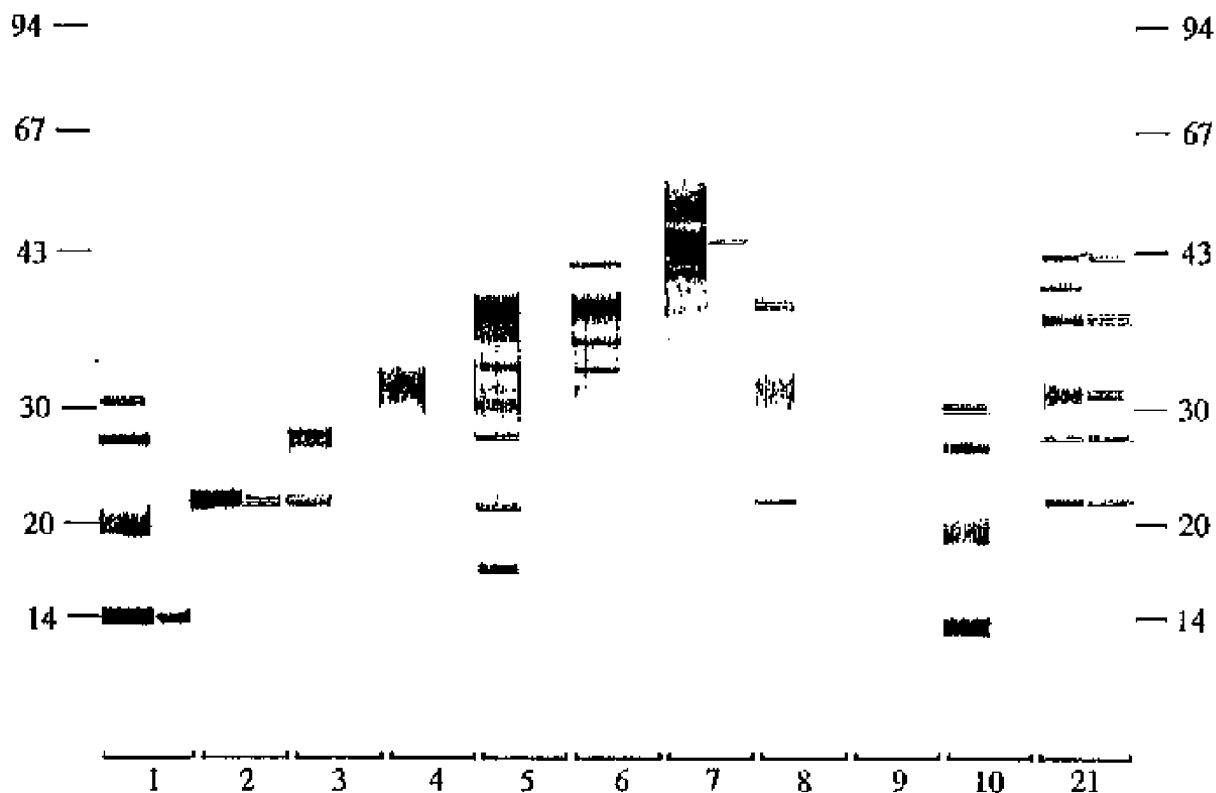
(A) Длина: 153 аминокислоты:

(B) Тип: аминокислота

(С) Топология: линейная
 (2) Молекулярный тип: белок
 (3) Описание последовательности: последовательность №4:

1 Gln Leu Cys Leu Ile Leu Phe Ala Thr Ser Val Leu Ala Gln Glu 15
 16 Tyr Lys Gly Met Gly Val Glu Thr Arg Thr Thr Glu Thr Pro Leu 30
 31 Arg Lys His Phe Asn Leu Thr Pro Val Gly Ser Gln Gly Ile Arg 45
 46 Leu Ser Trp Glu Val Gln His Leu Ser Asp Leu Lys Gly Thr Asp 60
 61 Ile Ser Leu Lys Ala Val Asn Pro Ser Asp Pro Leu Val Tyr Lys 75
 76 Arg Gln Thr Ala Lys Phe Ser Asp Gly Gln Leu Thr Ile Gly Glu 90
 91 Leu Lys Pro Ser Thr Leu Tyr Lys Met Thr Val Glu Ala Val Lys 105
 106 Ala Lys Lys Thr Ile Leu Gly Phe Thr Val Asp Ile Glu Thr Pro 120
 121 Arg Ala Gly Lys Lys Glu Ser Thr Val Met Thr Ser Gly Ser Ala 135
 136 Leu Thr Ser Ala Ile Ala Gly Phe Val Phe Ser Cys Ile Val Val 150

151 Val Leu Thr 153



Фиг.1

Формула винаходу

1. Очищенный антигенный полипептид с молекулярной массой в интервале 23-25 кДа при определении методом НДС-ПАГЭ, включающий аминокислотную последовательность

Leu Ile Leu Phe Ala Thr Ser Val Leu Ala Gln Glu Tyr Lys Gly
 Met Gly Val Glu Thr Arg Thr Thr Glu Thr Pro Leu Arg Lys His
 Phe Asn Leu Thr Pro Val Gly Ser Gln Gly Ile Arg Leu Ser Trp
 5 Glu Val Gln His Leu Ser Asp Leu Lys Gly Thr Asp Ile Ser Leu
 Lys Ala Val Asn Pro Ser Asp Pro Leu Val Tyr Lys Arg Gln

и который способен создавать у восприимчивого хозяина защитную иммунологическую реакцию на инфицирование *E. granulosus* или его пептидный фрагмент или вариант, обладающие эквивалентной с ним иммунологической активностью.

10 2. Очищенный антигенный полипептид по п. 1, отличающийся тем, что состоит из аминокислотной последовательности

Leu Ile Leu Phe Ala Thr Ser Val Leu Ala Gln Glu Tyr Lys Gly
 Met Gly Val Glu Thr Arg Thr Thr Glu Thr Pro Leu Arg Lys His
 Phe Asn Leu Thr Pro Val Gly Ser Gln Gly Ile Arg Leu Ser Trp
 15 Glu Val Gln His Leu Ser Asp Leu Lys Gly Thr Asp Ile Ser Leu
 Lys Ala Val Asn Pro Ser Asp Pro Leu Val Tyr Lys Arg Gln .

3. Очищенный антигенный полипептид по п. 1, отличающийся тем, что состоит из аминокислотной последовательности

20 Gln Leu Cys Leu Ile Leu Phe Ala Thr Ser Val Leu Ala Gln
 Glu Tyr Lys Gly Met Gly Val Glu Thr Arg Thr Thr Glu Thr
 Pro Leu Arg Lys His Phe Asn Leu Thr Pro Val Gly Ser Gln
 Gly Ile Arg Leu Ser Trp Glu Val Gln His Leu Ser Asp Leu
 Lys Gly Thr Asp Ile Ser Leu Lys Ala Val Asn Pro Ser Asp
 25 Pro Leu Val Tyr Lys Arg Gln .

4. Очищенный антигенный полипептид по п. 1, отличающийся тем, что включает аминокислотную последовательность

30 Gln Leu Cys Leu Ile Leu Phe Ala Thr Ser Val Leu Ala Gln Glu
 Tyr Lys Gly Met Gly Val Glu Thr Arg Thr Thr Glu Thr Pro Leu
 Arg Lys His Phe Asn Leu Thr Pro Val Gly Ser Gln Gly Ile Arg
 Leu Ser Trp Glu Val Gln His Leu Ser Asp Leu Lys Gly Thr Asp
 Ile Ser Leu Lys Ala Val Asn Pro Ser Asp Pro Leu Val Tyr Lys
 35 Arg Gln Thr Ala Lys Phe Ser Asp Gly Gln Leu Thr Ile Gly Glu
 Leu Lys Pro Ser Thr Leu Tyr Lys Met Thr Val Glu Ala Val Lys
 Ala Lys Lys Thr Ile Leu Gly Phe Thr Val Asp Ile Glu Thr Pro
 Arg Ala Gly Lys Lys Glu Ser Thr Val Met Thr Ser Gly Ser Ala
 Leu Thr Ser Ala Ile Ala Gly Phe Val Phe Ser Cys Ile Val Val
 40 Val Leu Thr .

5. Очищенный антигенный полипептид по п. 1, отличающийся тем, что состоит из аминокислотной последовательности

45 Gln Leu Cys Leu Ile Leu Phe Ala Thr Ser Val Leu Ala Gln Glu
 Tyr Lys Gly Met Gly Val Glu Thr Arg Thr Thr Glu Thr Pro Leu
 Arg Lys His Phe Asn Leu Thr Pro Val Gly Ser Gln Gly Ile Arg
 Leu Ser Trp Glu Val Gln His Leu Ser Asp Leu Lys Gly Thr Asp
 Ile Ser Leu Lys Ala Val Asn Pro Ser Asp Pro Leu Val Tyr Lys
 50 Arg Gln Thr Ala Lys Phe Ser Asp Gly Gln Leu Thr Ile Gly Glu
 Leu Lys Pro Ser Thr Leu Tyr Lys Met Thr Val Glu Ala Val Lys
 Ala Lys Lys Thr Ile Leu Gly Phe Thr Val Asp Ile Glu Thr Pro
 Arg Ala Gly Lys Lys Glu Ser Thr Val Met Thr Ser Gly Ser Ala
 Leu Thr Ser Ala Ile Ala Gly Phe Val Phe Ser Cys Ile Val Val
 55 Val Leu Thr .

6. Очищенный антигенный полипептид по любому из пп. 1-5, отличающийся тем, что является продуктом кодирующей их нуклеотидной последовательности в клетке-хозяине.

7. Очищенный антигенный полипептид по п. 6, отличающийся тем, что экспрессируются в клетке-хозяине в виде слитого белка.

60 8. Очищенный антигенный полипептид по п. 7, отличающиеся тем, что экспрессируются в виде слитого белка с глутатион s-трансферазой E.C 2.5.18 .

9. Препарат, способный создать у восприимчивого хозяина защитную иммунологическую реакцию на инфицирование *E. granulosus*, отличающийся тем, что включает компонент, выбранный из группы, включающей:

(а) полипептид по п. 1,

65 (b) пептидный фрагмент (а) с эквивалентной протективной иммунологической активностью,

(с) вариант (а) или (b), модифицированный вставкой, замещением или делецией одной или нескольких аминокислот и обладающий, по крайней мере, эквивалентной защитной иммунологической активностью.

10. Молекула ДНК, отличающаяся тем, что представляет собой нуклеотидную последовательность, выбранную из группы:

(а) нуклеотидной последовательности, кодирующей антигенный полипептид п. 1,

(b) нуклеотидной последовательности, кодирующей пептидный фрагмент антигенного пептида (а), причем фрагмент обладает эквивалентной полипептиду (а) протективной иммунологической активностью,

(с) нуклеотидной последовательности, кодирующей вариант полипептида (а) или пептида (b), в котором аминокислотная последовательность модифицирована вставкой, замещением или делецией одной или нескольких аминокислот, причем вариант обладает эквивалентной полипептиду (а) или пептидному фрагменту (b) протективной иммунологической активностью.

11. Молекула ДНК по п. 10, отличающаяся тем, что содержит ДНК-последовательность

```
GT CTC ATT TTG TTT GCG ACT TCA GTT TTG
GCT CAG GAA TAC AAA GGA ATG GGC GTA GAG
ACA AGG ACA ACA GAG ACT CCG CTC CGT AAA
CAC TTC AAT TTG ACT CCT GTG GGT TCT CAG
GGC ATT CGC TTA AGT TGG GAA GTC CAA CAC
TTG TCT GAC CTC AAA GGA ACA GAT ATT TCT
CTA AAA GCG GTG AAT CCT TCT GAC CCG TTA
GTC TAC AAA AGA CAA .
```

12. Молекула ДНК по п. 10, отличающаяся тем, что содержит ДНК-последовательность

```
CAG TTA TOT CTC ATT TTG TTT GCG ACT TCA GTT TTG GCT CAG GAA TAC AAA
Gln Leu Cys Leu Ile Leu Phe Ala Thr Ser Val Leu Ala Gln Glu Tyr Lys
```

```
GGA ATG GGC GTA GAG ACA AGG ACA ACA GAG ACT CCG CTC CGT AAA CAC TTC
Gly Met Gly Val Glu Thr Arg Thr Thr Glu Thr Pro Leu Arg Lys His Phe
```

```
AAT TTG ACT CCT GTG GGT TCT CAG GGC ATT CGC TTA ACT TGG GAA GTC CAA
Asn Leu Thr Pro Val Gly Ser Gln Gly Ile Arg Leu Ser Trp Glu Val Gln
```

```
CAC TTG TCT GAC CTC AAA GGA ACA GAT ATT TCT CTA AAA GCG GTG AAT CCT
His Leu Ser Asp Leu Lys Gly Thr Asp Ile Ser Leu Lys Ala Val Asn Pro
```

```
TCT GAC CCG TTA GTC TAC AAA AGA CAA ACT GCA AAA TTC TCA GAT GGA CAA
Ser Asp Pro Leu Val Tyr Lys Arg Gln Thr Ala Lys Phe Ser Asp Gly Gln
```

```
CTC ACT ATC GGC GAA CTG AAG CCC TCC ACA TTA TAC AAA ATG ACT GTG GAA
Leu Thr Ile Gly Glu Leu Lys Pro Ser Thr Leu Tyr Lys Met Thr Val Glu
```

```
GCA GTG AAA CCG AAA AAG ACC ATT TTG GGA TTC ACC GTA GAC ATT GAG ACA
Ala Val Lys Ala Lys Lys Thr Ile Leu Gly Phe Thr Val Asp Ile Glu Thr
```

```
CCG CCC GCT GGC AAG AAG GAA AGC ACT GTA ATG ACT AGT GGA TCC CCC TTA
Pro Arg Ala Gly Lys Lys Glu Ser Thr Val Met Thr Ser Gly Ser Ala Leu
```

```
ACA TCC GCA ATC GCT GGT TTT GTA TTC AGC TGC ATA GTG GTT GTC CTT ACT
Thr Ser Ala Ile Ala Gly Phe Val Phe Ser Cys Ile Val Val Val Leu Thr
```

13. Молекула ДНК по п. 10, отличающаяся тем, что содержит ДНК-последовательность

TC CAG TTA TOT CTC ATT TTO TTT GCG ACT TCA GTT TTG GCT CAG GAA TAC AAA
Gln Leu Cys Leu Ile Leu Phe Ala Thr Ser Val Leu Ala Gln Glu Tyr Lys

GGA ATG GGC GTA GAG ACA AGG ACA ACA GAG ACT CCG CTC CGT AAA CAC TTC
Gly Met Gly Val Glu Thr Arg Thr Thr Glu Thr Pro Leu Arg Lys His Phe

AAT TTG ACT CCT OTG GGT TCT CAG GGC ATT CCG TTA AGT TGG GAA GTC CAA
Asn Leu Thr Pro Val Gly Ser Gln Gly Ile Arg Leu Ser Trp Glu Val Gln

CAC TTG TCT GAC CTC AAA GGA ACA GAT ATT TCT CTA AAA GCG GTG AAT CCT
His Leu Ser Asp Leu Lys Gly Thr Asp Ile Ser Leu Lys Ala Val Asn Pro

TCT GAC CCG TTA GTC TAC AAA AGA CAA ACT GCA AAA TTC TCA GAT GGA CAA
Ser Asp Pro Leu Val Tyr Lys Arg Gln Thr Ala Lys Phe Ser Asp Gly Gln

CTC ACT ATC GGC GAA CTG AAG CCC TCC ACA TTA TAC AAA ATG ACT OTG GAA
Leu Thr Ile Gly Glu Leu Lys Pro Ser Thr Leu Tyr Lys Met Thr Val Glu

GCA OTG AAA GCG AAA AAG ACC ATT TTG GGA TTC ACC GTA GAC ATT GAG ACA
Ala Val Lys Ala Lys Lys Thr Ile Leu Gly Phe Thr Val Asp Ile Glu Thr

CCG CCG GCT GCG AAG AAG GAA AGC ACT GTA ATG ACT AOT GGA TCC GCT TTA
Pro Arg Ala Gly Lys Lys Glu Ser Thr Val Met Thr Ser Gly Ser Ala Leu

ACA TCC GCA ATC GCT GGT TTT GTA TTC AGC TGC ATA OTG GTT GTC CTT ACT
Thr Ser Ala Ile Ala Gly Phe Val Phe Ser Cys Ile Val Val Val Leu Thr

TGAACTCTCATGTAACTCAATGCAAAATTATCCACTGCTTCTATACTGAGTAGCAGACCCATAACTT

GCATTTTTCAAATAACTCTTCTTCCACATCAGGCTTCCCTTGCTCCGGAAGATGCACAAATCACCATT

TATTTTCGCTTTTAAACATTTGTATGACCTCTCATTTGTGGATTACTCCGAAATGACAAATACCGGA

CTTTGTCATATTTCCTTCATTGTTATCACCCCTTAATTCCAAATTCAGTCACTCG

14. Молекула ДНК по любому из пп. 10-13, отличающаяся тем, что выделена из природного источника.

15. Молекула кДНК, кодирующая антигенный полипептид по любому из пп.1-5.

16. Рекомбинантный вектор экспрессии, отличающийся тем, что содержит молекулу ДНК по любому из пп. 10-14.

17. Рекомбинантный вектор экспрессии, отличающийся тем, что содержит молекулу кДНК по п. 15.

18. Клетка-хозяин, трансформированная вектором по п. 16 и способная экспрессировать кодируемый полипептид или его пептидный фрагмент или его вариант.

19. Клетка-хозяин по п. 18, отличающаяся тем, что является прокариотической.

20. Клетка-хозяин по п. 19, отличающаяся тем, что прокариотический хозяин представлен E. coli.

21. Клетка хозяин по п. 18, отличающаяся тем, что является эукариотической.

22. Клетка-хозяин, трансформированная вектором по п. 17 и способная экспрессировать кодируемый полипептид или его пептидный фрагмент или его вариант.

23. Клетка-хозяин по п. 22, отличающаяся тем, что является прокариотической.

24. Клетка-хозяин по п. 23, отличающаяся тем, что прокариотический хозяин представлен E. coli.

25. Клетка-хозяин по п. 22, отличающаяся тем, что является эукариотической.

26. Способ продуцирования антигенного полипептида или его пептидного фрагмента, или варианта, способного создавать у восприимчивого хозяина защитную иммунологическую реакцию на инфицирование E. granulosus, включающий культивирование клетки по любому из пп. 18-21 и выделение экспрессированного продукта.

27. Способ продуцирования антигенного полипептида или его пептидного фрагмента или варианта, способного создавать у восприимчивого хозяина защитную иммунологическую реакцию на инфицирование E. granulosus, включающий культивирование клетки по любому из пп. 22-25 и выделение экспрессированного продукта.

28. Очищенный антигенный полипептид, пептидный фрагмент или вариант по любому из пп. 1-8, отличающийся тем, что получен способом по п. 26.

29. Очищенный антигенный полипептид, пептидный фрагмент или вариант по любому из пп. 1-8, отличающийся тем, что получен способом по п. 27.

30. Вакцина, содержащая иммунологически эффективное количество очищенного антигенного полипептида, пептидного фрагмента или его варианта по любому из пп. 1-8 или 28, 29 в смеси с фармацевтически приемлемым адъювантом, носителем или разбавителем.

31. Вакцина по п. 30, отличающаяся тем, что дополнительно содержит эффективное количество одного или нескольких полипептидов E. granulosus с молекулярными массами, определенными методом НДС-ПАГЭ, выбранными из 30 кДа, 34 кДа и 40 кДа или один или несколько фрагментов, или вариантов указанных полипептидов, имеющих эквивалентную иммунологическую активность.

32. Рекомбинантная вирусная вакцина, включающая нуклеиновую кислоту, кодирующую антигенный полипептид или пептидный фрагмент, или вариант по п. 1 и способная экспрессировать указанные

закодированные полипептид или пептидный фрагмент, или вариант.

33. Способ защиты хозяина, восприимчивого к инфицированию паразитами *Echinococcus* или *Taeniid* от заражения этими паразитами, включающий введение указанному хозяину иммунологически эффективного количества полипептида, пептидного фрагмента или варианта по любому из пп. 1-7 или 28, 29.

34. Способ защиты хозяина по п. 33, отличающийся тем, что паразит представлен *E. granulosus*.

35. Способ защиты хозяина по п. 33, отличающийся тем, что паразит представлен *E. multilocularis*, *E. vogelii*, *T. Ovis*, *T. Saginata*, *T. Solium*, *T. Multiceps* или *T. Hydatigena*.

36. Способ защиты хозяина, восприимчивого к инфицированию паразитами *Echinococcus* или *Taeniid* от заражения этими паразитами, включающий введение указанному хозяину иммунологически эффективного количества препарата по п. 9.

37. Способ защиты хозяина по п. 36, отличающийся тем, что паразит представлен *E. granulosus*.

38. Способ защиты хозяина по п. 36, отличающийся тем, что паразит представлен *E. multilocularis*, *E. vogelii*, *T. Ovis*, *T. Saginata*, *T. Solium*, *T. Multiceps* или *T. Hydatigena*.

39. Способ защиты хозяина, восприимчивого к инфицированию паразитами *Echinococcus* или *Taeniid* от заражения этими паразитами, включающий введение указанному хозяину иммунологически эффективного количества вакцины по любому из пп. 30, 31.

40. Способ защиты хозяина по п. 39, отличающийся тем, что паразит представлен *E. granulosus*.

41. Способ защиты хозяина по п. 39, отличающийся тем, что паразит представлен *E. multilocularis*, *E. vogelii*, *T. Ovis*, *T. Saginata*, *T. Solium*, *T. Multiceps* или *T. Hydatigena*.

42. Способ защиты хозяина, восприимчивого к инфицированию паразитами *Echinococcus* или *Taeniid* от заражения этими паразитами, включающий введение указанному хозяину иммунологически эффективного количества вакцины по п. 32.

43. Способ защиты хозяина по п. 42, отличающийся тем, что паразит представлен *E. granulosus*.

44. Способ защиты хозяина по п. 42, отличающийся тем, что паразит представлен *E. multilocularis*, *E. vogelii*, *T. Ovis*, *T. Saginata*, *T. Solium*, *T. Multiceps* или *T. Hydatigena*.

45. Очищенное антитело или его связывающий фрагмент, специфичные к антигенному полипептиду, пептидному фрагменту или варианту по п. 1.

46. Очищенное антитело или его связывающий фрагмент по п. 45, отличающийся тем, что его используют для идентификации протективного антигена паразита *Echinococcus* или *Taeniid*, отличного от *E. granulosus*,

47. Очищенное антитело или его связывающий фрагмент по п. 46, отличающийся тем, что его используют для идентификации протективного антигена паразита *E. multilocularis*, *E. vogelii*, *T. Ovis*, *T. Saginata*, *T. Solium*, *T. Multiceps* или *T. Hydatigena*, отличного от *E. granulosus*.

48. Произвольно меченая молекула ДНК, содержащая часть или всю нуклеотидную последовательность, представленную в п. 13 и пригодная для применения в качестве зонда для идентификации нуклеиновой кислоты, кодирующей протективный антиген паразита *Echinococcus* или *Taeniid*, отличного от *E. granulosus*.

49. Произвольно меченая молекула ДНК по п. 48, отличающаяся тем, что ее используют для идентификации протективного антигена паразита *Echinococcus* или *Taeniid*, отличного от *E. granulosus*.

50. Произвольно меченая молекула ДНК по п. 49, отличающаяся тем, что отличный от *E. granulosus* паразит представлен *E. multilocularis*, *E. vogelii*, *T. Ovis*, *T. Saginata*, *T. Solium*, *T. Multiceps* или *T. Hydatigena*.

51. Способ идентификации протективного антигена паразита *Echinococcus* или *Taeniid*, отличного от *E. granulosus*, включающий стадию идентификации гена паразита, имеющего нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере существенно гомологична части или всей нуклеотидной последовательности, представленной в п. 13.

