

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21)

201691202

(13)

A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2017.01.30

(51) Int. Cl. C07K 14/00 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
2015.01.09

---

(54) ФЛАГЕЛЛИН-СОДЕРЖАЩИЕ БЕЛКОВЫЕ НАНОЧАСТИЦЫ В КАЧЕСТВЕ  
ПЛАТФОРМЫ ДЛЯ ВАКЦИНЫ

---

(31) 14150600.6; 14189264.6

(57) Настоящее изобретение относится к белко-  
вым наночастицам, обладающим способностью са-  
мосборки, сконструированным из подходящих до-  
менов олигомеризации и дополнительно включаю-  
щих TLR5-связывающий белок флагеллин в каче-  
стве молекулы адьюванта. Более того, настоящее  
изобретение относится к применению таких нано-  
частиц для вакцинации.

(32) 2014.01.09; 2014.10.16

(33) ЕР

(86) РСТ/ЕР2015/050289

(87) WO 2015/104352 2015.07.16

(71) Заявитель:

АЛЬФА-О ПЕПТИДС АГ (CH)

(72) Изобретатель:

Буркхард Питер (US), Раман Сентил  
Кумар, Паулильо Сара Мария,  
Пьяцца Маттео, Кулангара Кэролайн,  
Миттельхольцер Кристиан (CH)

(74) Представитель:

Нилова М.И. (RU)

201691202

A1

A1

201691202

## **Флагеллин-содержащие белковые наночастицы в качестве платформы для вакцины**

### **Область техники**

5

Настоящее изобретение относится к белковым наночастицам, обладающим способностью самосборки, которые включают белковую последовательность TLR5-связывающего белка флагеллина в качестве встроенного адьюванта. Более того, настоящее изобретение относится к применению таких наночастиц для вакцинации.

10

### **Уровень техники**

Первой линией защиты против инвазивных агентов является врожденный иммунитет хозяина, и толл-подобные рецепторы (TLR), которые представляют собой рецепторы, связанные с мембраной, играют в нем ключевую роль (Yoon S.I. и др., Science 2012, 335:859-64). TLR распознают антигены с высоко консервативной структурой молекул посредством применения своих эктодоменов с богатыми лейцином повторами (LRR). Данный LRR имеет форму подковы. Каждый TLR обладает определенным лиганд-связывающим доменом, который распознает свой конкретный молекулярный антиген, который может представлять собой специальные формы нуклеиновых кислот вирусов или бактерий, поверхностные молекулы бактерий, такие как липополисахариды (LPS), или другие молекулы, ассоциированные с патогенами, обладающие определенной структурой. Даже при том, что они распознают различные неродственные молекулярные антигены, все известные структуры TLR, активированных агонистами, т.е. TLRs, которые распознали и связали свой молекулярный антиген, образуют однотипную димерную структуру после связывания с антигеном, которая приводит их С-концевые области в непосредственную близость друг от друга, что, в свою очередь, активирует их внутриклеточные домены рецептора толл/интерлейкина-1 (TIR) и, таким образом, инициирует каскады клеточных сигналов.

25  
30

Что касается объема настоящего изобретения, интересно отметить, что из множества различных рецепторов TLR, TLR5 является единственным белок-связывающим TLR, который консервативен у позвоночных от рыб до млекопитающих. TLR5 связывается с разобранной формой флагеллина филамента плетевидного жгутика из бета- и гамма-

протеобактерий, которая отвечает за перемещение флагеллина. В результате недавних кристаллографических исследований обнаружили димерный комплекс между флагеллином и TLR5. После связывания флагеллина с TLR5, индуцируется MyD88-зависимый сигнальный путь, который, в свою очередь, активирует провоспалительный фактор транскрипции NF-кВ в дендритных клетках, моноцитах и эпителиальных клетках, приводя, в конечном итоге, к врожденному иммунному ответу против жгутиковых бактерий.

- Флагеллин имеет молекулярную архитектуру, которая состоит из четырех доменов D0, D1, D2 и D3. Белковая цепь начинается с N-концевой области домена D0 и образует большую петлю, проходящую через другие домены D1, D2 и D3, дойдя до кончика молекулы, указанная цепь поворачивает и уходит назад через D3, D2 и D1, при этом приводя ее C-концевую область в домене D0 в непосредственную близость к N-концевой области. Флагеллин способен активировать врожденную иммунную систему двумя путями. Первый путь заключается в связывании с рецептором TLR5, главным образом, через высоко консервативный участок его домена D1 (Yoon и др., см. ссылку выше.). Другой путь активации заключается во взаимодействии с инфламмасомой, главным образом, через высоко консервативный C-концевой участок его домена D0 (Lightfield K.L. и др, Nat Immunol, 2008, 9:1171-8).
- Флагеллин применяли в качестве традиционного адьюванта, т.е. в качестве отдельного компонента, который вводят совместно с антигеном, или который также был разработан таким образом, чтобы содержать сам антиген в своей собственной молекулярной архитектуре. Второй подход обладает тем преимуществом, что эффект адьюванта колокализован с эффектом антигена, в результате чего дозировку адьюванта можно значительно уменьшить и, как следствие, побочные эффекты также можно значительно снизить.

Одно из возможных ограничений флагеллина состоит в его способности индуцировать воспалительные иммунные реакции. Возможно уменьшение воспалительной части иммунной стимуляции посредством конструирования производных флагеллина, у которых отсутствует C-концевой участок D0, который взаимодействует с инфламмасомой.

Многие адьюванты обладают существенными ограничениями в своем применении в связи с их сильными побочными эффектами. К примеру, полный адьювант Фрейнда, который

представляет собой очень сильный иммуностимулирующий состав, больше не может применяться даже в экспериментах на животных. В настоящее время существует лишь несколько одобренных адьювантов для применения в медицине, наиболее важными из которых являются квасцы. Одним из возможных способов уменьшения побочных эффектов

5 системно применяемых адьювантов является их приготовление в виде дисперсной системы, т.е. включение адьювантов в аэрозоль или в масляную эмульсию, которые могут устраниć побочные эффекты и сконцентрировать адьювант в непосредственной близости от представляющего интерес антигена. Таким образом, антиген и адьювант могут одновременно достигнуть одного и того же лимфоузла, увеличивая в результате эффект 10 адьюванта при одновременном снижении системных побочных эффектов адьюванта.

Флагеллин в частности представляет собой адьювант, привлекательный для применения в белковых наночастицах, таких как те, которые описаны в публикации WO 2004/071493, поскольку флагеллин сам по себе является белком, в отличие от многих других адьювантов, которые представляют собой небольшие молекулы, такие как имиквимод, или объекты, имеющие в основе нуклеиновую кислоту, такие как CpG. Поскольку флагеллин представляет собой белок, на его основе можно сконструировать наночастицу при помощи средств молекулярной биологии без необходимости использования химических сшивок.

## **20 Краткое описание изобретения**

Настоящее изобретение относится к белковой наночастице, обладающей способностью самосборки, которая состоит из агрегатов множества строительных блоков согласно Формуле (Ia) или (Ib)

25 X – ND1 – L1 – ND2 – FLA (Ia) или FLA – ND1 – L1 – ND2 – X (Ib),  
состоящих из непрерывной цепи, содержащей домен олигомеризации белка ND1, линкер  
L1, домен олигомеризации белка ND2, производное флагеллина FLA и дополнительный  
30 заместитель X, при этом

ND1 представляет собой белок, который образует олигомеры  $(ND1)_m$  из m субъединиц ND1,

ND2 представляет собой белок, который образует олигомеры  $(ND2)_n$  из n субъединиц ND2,

каждое m и n представляет собой число от 2 до 10 при условии, что m не равно n и не кратно n, а n не кратно m,

- 5 L1 представляет собой связь или короткий гибкий линкер,

FLA представляет собой флагеллин или производное флагеллина, у которого отсутствуют части аминокислотной последовательности флагеллина, но по меньшей мере присутствует TLR5-связывающий домен D1, и при этом необязательно отсутствующий(-ие) домен(-ы) заменен(-ы) гибким линкерным сегментом от 1 до 20 аминокислот, соединяющим два конца оставшейся последовательности флагеллина, или заменен(-ы) полностью уложенным (фолдированным) белковым антигеном;

X отсутствует или представляет собой последовательность пептида или белка, содержащую от 1 до 1000 аминокислот,

необязательно совместно собранную со множеством строительных блоков согласно формуле (II),

$$20 \quad Y - ND3 - L2 - ND4 - Z \quad (II),$$

состоящих из непрерывной цепи, содержащей домен олигомеризации белка ND3, линкер L2, домен олигомеризации белка ND4 и дополнительные заместители Y и Z, при этом

25 ND3 представляет собой белок, который образует олигомеры  $(ND3)_y$  из y субъединиц ND3,

ND4 представляет собой белок, который образует олигомеры  $(ND4)_z$  из z субъединиц ND4,

каждое y и z представляет собой число от 2 до 10 при условии, что y не равно z и не кратно z, и z не кратно y, и при этом

либо ND3 идентичен ND1, либо ND4 идентичен ND2, или оба ND3 и ND4 идентичны ND1 и ND2, соответственно,

L2 представляет собой связь или короткий гибкий линкер, который может отличаться от L1 или быть идентичен L1, и

Z и Y независимо друг от друга отсутствуют или представляют собой последовательность

- 5 белка или пептида, содержащую от 1 до 1000 аминокислот.

### **Краткое описание фигур**

*Фигура 1: Схематическое представление различных белковых наночастиц, состоящих из 10 совместно собранных эпитоп-содержащих цепей и флагеллин-содержащих цепей или цепей, содержащих производное флагеллина, в вертикальном положении.*

В верхнем левом углу представлен мономер флагеллин-содержащей белковой цепи, слитый с доменами олигомеризации ND2 и ND1; справа представлена совместно собранная 15 наночастица с ND3-L2-ND4-Z в соотношении 1:59, предполагающая T=1 икосаэдрическую симметрию.

Для наглядности, наиболее вероятно разупорядоченные, гистидиновые метки (X и Y) не представлены.

"ND1" и "ND3": пентамерные домены олигомеризации; "ND2" и "ND4": тримерные домены 20 олигомеризации; "FLA": флагеллин или производное флагеллина; "Z": эпитоп

A) Модель флагеллина D0-D1-D2-D3 и соответствующая эпитоп-презентирующая наночастица.

B) Модель флагеллина D0-D1-D2 и соответствующая эпитоп-презентирующая наночастица.

25 C) Модель флагеллина D0-D1 и соответствующая эпитоп-презентирующая наночастица.

D) Модель флагеллина D1-D2-D3 и соответствующая эпитоп-презентирующая наночастица.

E) Модель В-клеточного эпитопа NANP (Z), слитого с доменом олигомеризации ND4 края 30 ND3-L2-ND4.

*Фигура 2: Схематическое изображение взаимодействия флагеллина с TLR5.*

В идеале флагеллин должен быть димерным и располагаться в перевернутой ориентации на наночастицах. Представляемая часть белковых цепей начинается с (например,

пентамерного) домена олигомеризации ND1, который присоединен к (например, димерному) домену олигомеризации ND2 при помощи линкера L, дополнительно соединенного с производным флагеллина FLA, состоящего из D2, и далее домена D1 флагеллина до кончика (T) включительно. На кончик присоединяют последовательность

- 5 D1, которая укладывается сама на себя и в домен D2. Для наглядности наиболее вероятно, разупорядоченные, гистидиновые метки не представлены.

A) Слева: Модель мономера. Справа: Модель димера, в котором флагеллин удерживают в правильной димерной конформации для взаимодействия с TLR5.

- 10 B) Верхняя вставка: Модель димера флагеллина, взаимодействующего с димером TLR5. Нижняя вставка, слева: Модель полностью собранной "только флагеллиновой" частицы в обрезанном представлении. Справа: Модель полностью собранной "только флагеллиновой" частицы в полном представлении.

- 15 *Фигура 3: Карта вектора pPEP-T.*

"rgom": промотор; "term": терминатор; "ori": точка начала репликации; "bp": пары нуклеотидных оснований; "amp": ген устойчивости к ампициллину.

- 20 *Фигура 4: Микроизображения белковых наночастиц в просвечивающем электронном микроскопе*

После рефолдинга и совместной сборки рекомбинантно экспрессированных белков, образцы адсорбировали на решетках с покрытием из углерода и негативно окрашивали 2% 25 уранилацетатом.

- A) T81c-WRW-8RRVRA-D0-D1 : T81c-WRW-8RRVRA-T1BT\* соотношение совместной сборки 12:48, описано в разделе "Разработка FLA-SAPN" и Примере 6. Отрезок отображает 500 нм.
- B) T81c-8-D0-D1 : T81c-8-Pf соотношение совместной сборки 3:57, описано в Примере 8. 30 Отрезок отображает 200 нм.
- C) PD52-2i88-PANDORA-D2-D1-ori: PD52-2i88-PANDORA-Noro соотношение совместной сборки 5:55, описано в Примере 7. Отрезок отображает 200 нм.
- D) DIM-D0-D1 : DIM-D2-D1-tip3\_NIC-pept соотношение совместной сборки 5:55, описано в Примере 9. Отрезок отображает 200 нм.

*Фигура 5: ДСН-ПААГ-электрофорез конструкции LONG-D2-D1-ori Примеров 1 и 5.*

Данная конструкция обладает теоретической молекулярной массой 41,1 кДа

5 CL - Очищенный лизат

FT – Проба после колонки

1 - pH 8,0 промывка с 10 mM имидазола

2 - pH 8,0 промывка с 500 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

3 - pH 6,3 промывка

10 4 - pH 5,9 промывка

5 - pH 4,5 промывка

Elu - элюирование 250 mM имидазола, 5 и 10 мкл образца нанесенно на гель.

*Фигура 6: Микроизображения в просвечивающем электронном микроскопе белковых*

15 *наночастиц конструкции LONG-D2-D1-ori при различных разрешениях*

После рефолдинга и совместной сборки рекомбинантно экспрессированного белка, наночастицы адсорбировали на решетках с покрытием из углерода и негативно окрашивали 2% уранилацетатом.

20 Отрезок отображает 1000 нм, 500 нм, 200 нм и 100 нм для верхнего правого, левого верхнего, нижнего правого и левого нижнего изображений соответственно.

*Фигура 7: Активация клеточного пути TLR5.*

25 A) Long-D2-D1-ori (Пример 5)

B) T81c-WRW-8RRVRA-D0-D1 : T81c-WRW-8RRVRA-T1BT\* (12:48) (Пример 6)

C) PD52-2i88-PANDORA-D2-D1-ori : PD52-2i88-PANDORA-Noro (5:55) (Пример 7)

Верхние вставки: оценка чувствительной к дозе активности

Нижние вставки: оценка EC<sub>50</sub>

30

IMG-2205: флагеллин *Salmonella Typhimurium* (0,29 нг/мл), положительный контроль

Ось X: Концентрация (нг/мл) наночастицы

Ось Y: экспрессия SEAP (нг/мл) или % A =% активности

*Рисунок 8: ИФА анализ связывания титров антитела после иммунизации мышей C57Bl/6 (отписано в Примерах 8 [вставка А] и 9 [вставка Б]).*

A)

- 5 ■ Отдельно T81c-8-Pf в дозе 1 мкг  
 ♦ Отдельно T81c-8-Pf в дозе 10 мкг  
 X Совместная сборка T81c-8-D0-D1 и T81c-8-Pf в соотношении 3:57 и дозе 1 мкг  
 ▲ Совместная сборка T81c-8-D0-D1 и T81c-8-Pf в соотношении 3:57 и дозе 10 мкг  
 ● Совместная сборка T81c-8-D0-D1 и T81c-8-Pf в соотношении 9:51 и дозе 1 мкг  
 10 Ж Совместная сборка T81c-8-D0-D1 и T81c-8-Pf в соотношении 9:51 и дозе 10 мкг  
 Ось X: коэффициент разбавления сыворотки  
 Ось Y: OD = оптическая плотность  
 Планшет ИФА покрывают полным иммуногеном, применяемым для иммунизации

15 B)

- Совместная сборка DIM-D0-D1 и DIM-D2-D1-tip3\_NIC-pept в соотношении 5:55 и дозе 10 мкг  
 ■ Никотин, соединенный с носителем гемоцианином фиссуреллы в дозе 10 мкг  
 Ось X: коэффициент разведения сыворотки  
 20 Ось Y: OD = оптическая плотность  
 Планшет ИФА покрывают только никотином, прикрепленным к несвязанному носителю

*Фигура 9: Микроизображения в просвечивающем электронном микроскопе белковых наночастиц конструкции Nic-DEDL*

- 25 После рефолдинга и совместной сборки рекомбинантно экспрессированного белка, наночастицы адсорбировали на решетках с покрытием из углерода и негативно окрашивали 2% уранилацетатом. Отрезок отображает 1000 нм.

30 *Фигура 10: Образование антител*

Иммунизацию групп из трех мышей C57Bl/6 осуществляли подкожно либо 10 мкг Nic-DEDL (Пример 10), либо 10 мкг Nic-KLH (никотин, соединенный с носителем гемоцианином фиссуреллы) в качестве положительного контроля тремя инъекциями

каждой с интервалом в неделю. Титр антител в нулевой день (т.е. до первой инъекции) и далее неделю спустя после каждой инъекции определяли при помощи ИФА.

D = количество дней после первой иммунизации; A = титр антитела (логарифмическая шкала  $\log_2$ ).

5

### **Подробное описание изобретения**

В настоящем изобретении описаны различные формы флагеллина, которые включают в 10 себя различные домены флагеллина в любой ориентации, встроенного в наночастицы. Некоторые из конструкций имеют в составе флагеллин, прикрепленный к наночастицам через свои N- и C-концевые области в непосредственной близости к поверхности наночастицы (Фигура 1), в то время как в других конструкциях дальние участки флагеллина расположены в непосредственной близости к поверхности наночастицы, тем самым 15 представляя флагеллин в перевернутой ориентации на наночастицах (Фигура 2).

Так как воспалительные иммунные реакции являются одной из главных проблем адьювантов и в частности TLR-связывающих адьювантов, выгодно уменьшать их способность индуцировать воспалительные реакции. Известно, что C-концевой участок 20 флагеллина, который является частью домена D0, содержит пептидную последовательность, которая взаимодействует с инфламмасомой и, следовательно, ответственна за воспалительные реакции флагеллина. Таким образом, были разработаны конструкции на основе флагеллина, у которых отсутствует C-концевой участок домена D0, который активирует инфламмасому (Фигура 2).

25

Изобретение относится к белковой наночастице, обладающей способностью самосборки, которая состоит из агрегатов множества строительных блоков Формулы (Ia) или (Ib)

X – ND1 – L1 – ND2 – FLA (Ia)      или      FLA – ND1 – L1 – ND2 – X (Ib),

30

состоящих из непрерывной цепи, содержащей домен олигомеризации белка ND1, линкер L1, домен олигомеризации белка ND2, производное флагеллина FLA и дополнительный заместитель X, при этом

ND1 представляет собой белок, который образует олигомеры  $(ND1)_m$  из m субъединиц ND1,

ND2 представляет собой белок, который образует олигомеры  $(ND2)_n$  из n субъединиц ND2,

- 5    каждое m и n представляет собой число от 2 до 10 при условии, что m не равно n и не кратно n, а n не кратно m,

L1 представляет собой связь или короткий гибкий линкер,

- 10    FLA представляет собой флагеллин или производное флагеллина, у которого отсутствуют части аминокислотной последовательности флагеллина, но у которого по меньшей мере присутствует TLR5-связывающий домен D1, и при этом необязательно отсутствующий(-ие) домен(-ы) заменен(-ы) гибким линкерным сегментом от 1 до 20 аминокислот, соединяющим два конца оставшейся последовательности флагеллина, или заменен(-ы) полностью уложенным белковым антигеном;
- 15

X отсутствует или представляет собой пептидную или белковую последовательность, содержащую от 1 до 1000 аминокислот,

- 20    необязательно совместно собранную со множеством строительных блоков согласно Формуле (II),

$$Y - ND3 - L2 - ND4 - Z \quad (II),$$

- 25    состоящих из непрерывной цепи, содержащей домен олигомеризации белка ND3, линкер L2, домен олигомеризации белка ND4 и дополнительные заместители Y и Z, при этом

ND3 представляет собой белок, который образует олигомеры  $(ND3)_y$  из y субъединиц ND3,

- 30    ND4 представляет собой белок, который образует олигомеры  $(ND4)_z$  из z субъединиц ND4, каждое y и z представляет собой число от 2 до 10 при условии, что y не равно z и не кратно z, и z не кратно y, и при этом

либо ND3 идентичен ND1, либо ND4 идентичен ND2, или оба ND3 и ND4 идентичны ND1 и ND2 соответственно,

L2 представляет собой связь или короткий гибкий линкер, который может отличаться от L1  
5 или быть идентичен L1, и

Z и Y независимо друг от друга отсутствуют или представляют собой пептидную последовательность от 1 до 100 аминокислот, содержащую от 1 до 1000 аминокислот.

10 Белковые частицы согласно настоящему изобретению обеспечивают очень эффективный способ колокализации молекулы адьюванта с представляющим интерес иммуногеном, следовательно, адьювантное свойство флагеллина можно колокализовать с вакцинным антигеном против которого желательна иммунная реакция. Посредством совместной сборки двух белковых цепей, формирующих наночастицу, одной с флагеллином или с  
15 производным флагеллина (FLA) в молекуле согласно Формуле (Ia) или (Ib), другой согласно Формуле (II), содержащей антиген, представляющий интерес (Y или Z), в одну единую белковую наночастицу, адьювант и антиген полностью колокализованы. В связи с этим в данных конструкциях адьювантный эффект сочетается с преимуществом от того, что на наночастицах антиген представлен многократно. Кроме того, силу адьювантного действия  
20 можно увеличить или уменьшить при помощи применения различных соотношений при совместной сборке флагеллин-содержащих белковых цепей согласно Формуле (Ia) или (Ib) с антиген-содержащими белковыми цепями согласно Формуле (II). Адьювантный эффект подбирают для того, чтобы найти оптимальный вариант между наилучшей антигеннстью и наименьшим побочным эффектом.

25 Как было указано выше, FLA представляет собой флагеллин или производное флагеллина, у которого отсутствуют части аминокислотной последовательности флагеллина, но который по меньшей мере содержит TLR5-связывающий домен D1. Отсутствующий(-ие) домен(-ы) можно заменить гибким линкерным сегментом от 1 до 20 аминокислот,  
30 соединяющим два конца оставшейся последовательности флагеллина, или их можно заменить полностью уложенным белковым антигеном. Область гибкого линкера может содержать подходящие сайты присоединения для ковалентного связывания антигенов.

Сами по себе флагеллин-содержащие наночастицы (т.е. без совместной сборки с антиген-содержащей белковой цепью, формирующей наночастицу) можно применять в качестве обычного адьюванта, который просто добавляют к любой форме доставки антигена в рассматриваемой вакцине.

- 5 В качестве дополнительного альтернативного варианта, антигены можно конструировать в качестве заместителя X на только флагеллин-содержащих белковых цепях, формирующих наночастицу, согласно Формуле (Ia) или (Ib), т.е. опять таки без совместной сборки с антиген-содержащей белковой цепью, формирующей наночастицу, согласно Формуле (II)
- 10 для того, чтобы добиться максимальных преимуществ от адьюванного эффекта и эффекта от того, что антиген представлен многократно, применяя антиген X в качестве В-клеточного эпитопа и производного флагеллина FLA в качестве адьюванта.

В связи с тем, что в архитектуре флагеллина белковая цепь проходит в виде петли через все 15 домены D0, D1, D2 и D3 и снова возвращается обратно, можно удалить один или несколько доменов из последовательности посредством воссоединения двух концов в непрерывную пептидную цепь, что приводит в результате к производному флагеллину FLA. Таким образом, конструкцию производного флагеллина, в которой отсутствуют домены флагеллина D2 и D3, можно сконструировать просто посредством соединения белковой 20 цепи на стыке доменов D1 и D2. Аналогичным образом, концевые домены (либо D3, либо D2 и D3 совместно) можно заменить белковым антигеном, при условии, что данный белковый антиген с его N- и C-концами можно соединить с N- и C-концами на стыке между D1 и D2. Концевые домены D2 и D3 можно также заменить пептидной последовательностью с подходящими остатками для ковалентного связывания молекул 25 антигена. Примером такой пептидной петли является последовательность KYKDGDKGDDK (SEQ ID №: 1), которая содержит четыре остатка лизина для ковалентного связывания с его первичной аминогруппой. Такая гидрофильная петля, включающая остатки лизина, обеспечивает сайты связывания для ковалентного присоединения молекул лиганда к первичной аминогруппе боковой цепи лизина. Замена 30 остатков лизина в последовательности флагеллина посредством аргинина приводит к удалению нежелательных сайтов связывания в остальной части молекулы. Две данные модификации образуют производное флагеллина со следующей последовательностью:

MAQVINTNSLSLLTQNNLNRSQSALGTAIERLSSGLRINSARDDAAGQAIANRFTANIRG  
 LTQASRNANDGISIAQTTEGALNEINNLQRVRELAVQSANSTNSQSDLDSIQAEITQRL  
 NEIDRVSGQTQFNGVRVLAQDNTLTIQVGANDGETIDIDLRQINSQTLGLDQLNVQQKY  
KDGDKGDDKTENPLQRIDAALAQVDALRSDLGAVQNRFNSAITNLGNTVNNLSEARSR

5 IEDSDYATEVSNMSRAQILQQAGTSVLAQANQVPQNVLSLLR (SEQ ID №: 28)

Дополнительно, в объем настоящего изобретения включено конструирование флагеллина в виде димера на наночастице. Таким образом, оптимизировано взаимодействие с TLR5, который также является димером. Этого легко достигнуть посредством применения 10 димерного домена олигомеризации белка, такого как ND1 (m равен 2) или ND2 (n равен 2), и его применения в качестве сайта присоединения для производного флагеллина FLA, т.е. как это показано в Формуле (Ib) или (Ia) соответственно. Это принудительно переводит производное флагеллина в димерную форму, которая более легко взаимодействует с TLR5 (Фигура 2). Предпочтительно, чтобы в такой конструкции димерный домен 15 олигомеризации в строительном блоке согласно Формуле (Ia) или (Ib), к которому присоединен флагеллин (либо ND2 в Формуле (Ia), либо ND1 в Формуле (Ib)), отличался от соответствующего домена олигомеризации в строительном блоке согласно Формуле (II) (либо ND4 при совместной сборке с цепями согласно Формуле (Ia), либо ND3 при совместной сборке с цепями согласно Формуле (Ib)). Предпочтительно димерный домен 20 олигомеризации в строительном блоке согласно Формуле (Ia) или (Ib) обладает более сильным взаимодействием, т.е. способностью к формированию димера, чем соответствующий домен олигомеризации (ND3 или ND4) в строительном блоке согласно Формуле (II). Это обеспечивает гарантию того, что в совместно собранной наночастице со 25 строительными блоками согласно Формуле (Ia) или (Ib) и Формуле (II) флагеллин или производное флагеллина FLA всегда образует димер на смежных строительных блоках согласно Формуле (Ia) или (Ib), и не распределен в качестве одиночного мономера по всей совместно собранной наночастице.

Кроме того, посредством конструирования флагеллина в перевернутой ориентации 30 преимущественно в виде димера на наночастице, можно оптимизировать взаимодействие с димером TLR5 (Фигура 2). Такая наночастица является предпочтительной. Например, конструкцию флагеллина D1-D2 можно сконструировать посредством соединения белковых цепей с пептидной последовательностью подобной KAKKKDGKDDKDS (SEQ ID №: 29, "T" в Фигуре 2) на стыке между доменом D0 и D1, таким образом минуя домен

D0, и полного удаления домена D3 без воссоединения белковых цепей. Следовательно, у образующейся в результате молекулы флагеллина N- и C-концы будут располагаться в области D2 с образованием последовательности, подобной

5 SARLSDLEANNAVRGESKITVNGAEYTANATGDRITLAGRTMFIDRTASGVSTLINEDA  
AAARRSTANPLASIDSALSRVDAVRSSLGAIQNRFDSAKAKKKDGKDDKDSKNANDGI  
SIAQTTEGALNEINNNLQRVRELSVQATNGTNSDSDLRSIQDEIQQRLEEIDRVSNQTQFN  
GVKVLSQDNQMKIQVGAKDGETITIDLQKIDVKSLGLDFNVNGPREATVGDLRSSFRN  
VTGYDTYAAGADRYRVDINSGAV

10 (SEQ ID №:30)

Можно было применять аналогичные последовательности гибкого линкера ("T" в Фигуре 2), имеющие от 1 до 20 аминокислот, такие как, к примеру, GS или GKDGDGKDG (SEQ ID №: 31) или GKDGDGKDGKDG (SEQ ID №: 32). Предпочтительно последовательности линкера содержат, главным образом, заряженные или полярные аминокислоты с располагающимися между ними остатками глицина для того, чтобы сделать линкер гибким. Во избежание нежелательных сайтов связывания на данной конструкции D2-D1, остатки лизина заменяют остатками аргинина.

20 Далее производное флагеллина FLA должно быть соединено с димерным доменом олигомеризации ND1 или ND2 в части D2 флагеллина. Приготовление наночастицы из такого строительного блока либо отдельной, либо совместно собранной с соответствующим строительным блоком согласно Формуле (II), будет образовывать предпочтительную наночастицу с производным флагеллином в перевернутой ориентации.

25

#### *Мономерные строительные блоки*

Пептид (или полипептид, или белок) представляет собой цепь или последовательность аминокислот, ковалентно связанных амидными связями. Пептид может быть природным, 30 природным модифицированным, частично синтетическим или полностью синтетическим. Природные модифицированные, частично синтетические или полностью синтетические понимают в том значении, что они не встречаются в природе. Термин аминокислота одновременно охватывает встречающиеся в природе аминокислоты, выбранные из 20 незаменимых  $\alpha$ -L-аминокислот, синтетических аминокислот, таких как  $\alpha$ -D-аминокислоты,

6-аминогексановая кислота, норлейцин, гомоцистеин или подобные им, также, как и встречающиеся в природе аминокислоты, которые некоторым образом модифицировали для изменения некоторых свойств, таких как заряд, такие как фосфосерин или фосфотирозин или другие модификации, такие как *n*-октаноил-серин, или подобные им. У производных аминокислот аминогруппа, формирующая амидную связь, является алкилированной, или боковая цепь амино-, гидрокси или тиогруппы является алкилированной или ацилированной, или боковая цепь карбоксигруппы является амидированной или этерифицированной. Предпочтительно, белок согласно настоящему изобретению содержит аминокислоты, выбранные из 20 незаменимых природных  $\alpha$ -L-аминокислот.

В грубом приближении, пептиды можно отличить от белков на основе их размера, т.е. приблизительно цепь из 50 аминокислот или менее можно рассматривать в качестве пептида, в то время как более длинные цепи можно считать белками. Дипептиды представляют собой самые короткие пептиды и состоят из 2-х аминокислот, соединенных одной пептидной связью. Точно также трипептиды состоят из трех аминокислот, тетрапептиды состоят из четырех аминокислот и т.д. Полипептид представляет собой длинную, непрерывную и неразветвленную пептидную цепь. В литературе границы размера, отличающего пептиды из белков, являются несколько расплывчатыми. Иногда длинные "пептиды", такие как бета-амилоид, рассматривали в качестве белка, и наоборот, меньшие белки, такие как инсулин, упоминали как пептиды.

Короткую подвижную линкерную цепь L1 или L2 выбирают из необязательно замещенных атомов углерода, необязательно замещенных атомов азота, атомов кислорода, атомов серы и их комбинаций, с предпочтительно 1 до 60 атомами, в частности, содержащих от 1 до 20 атомов в цепи. Такая короткая подвижная линкерная цепь представляет собой, к примеру, цепь полиэтиленокси, гибкую сахарную цепь или, предпочтительно, гибкую пептидную цепь, к примеру, пептидную цепь, состоящую из 1 до 20 аминокислот, в частности, от 1 до 6 аминокислот, содержащую одну или нескольких аминокислот глицина. Наиболее предпочтительные линкеры состоят из 1 до 6 аминокислот с высоким содержанием глицина.

Домены олигомеризации согласно настоящего изобретения предпочтительно представляют собой суперспирали. Суперспираль представляет собой белковую последовательность с

непрерывной структурой в основном гидрофобных остатков с интервалом в 3 и 4 остатка, которая организуется с формированием мультимерной группы спиралей, как будет более подробно объяснено в данной заявке ниже.

- 5 Домены олигомеризации, которые не являются суперспиралями, представляют собой, к примеру, домен тримеризации (фолдон) белка фибритина бактериофага T4 (Tao, Y. и др., Structure 1997, 5:789-798).

Домены олигомеризации ND1, ND2, ND3 и/или ND4 и линкеры L1 и/или L2 можно 10 необязательно также заместить нацеливающими частицами или заместителями, усиливающими адьювантные свойства наночастицы, такими как иммуностимулирующая нуклеиновая кислота, предпочтительно олигодезоксинуклеотид, содержащий дезоксиинозин, олигодезоксинуклеотид, содержащий дезоксиуридин, олигодезоксинуклеотид, содержащий мотив CG, CpGs, имиквимод, резиквимод, 15 гардиквимод, инозин и цитидин, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты, или подобные им. Другие заместители, усиливающие адьювантные свойства наночастицы, представляют собой антимикробные пептиды, такие как катионные пептиды, которые 20 являются классом иммуностимулирующих, положительно заряженных молекул, которые могут способствовать и/или улучшать адаптивные иммунные реакции. Примером такого пептида с иммуностимулирующими свойствами является положительно заряженный искусственный антимикробный пептид KLKLLLLKLK (SEQ ID №: 2), который индуцирует сильный адаптивный иммунитет, запускаемый специфическим белком типа 2, после иммунизации в режиме прайм-буст. Конкретная нацеливающая частица, рассматриваемая в качестве заместителя, представляет собой ER-нацеливающий сигнал, 25 т.е. сигнальный пептид, который индуцирует перенос белка или пептида к эндоплазматическому ретикулуму (ER).

Необязательные заместители, к примеру, те необязательные заместители, которые описаны 30 в данной заявке выше, предпочтительно соединяют с подходящими аминокислотами ближе к концу и напротив конца, связанного с L1 или L2 домена олигомеризации ND1, ND2, ND3 и/или ND4. При самосборке белковой наночастицы такие заместители далее будут присутствовать на поверхности наночастицы. Такие заместители можно присоединять к концу непрерывной белковой цепи, или можно присоединять к боковой цепи

функциональной группы аминокислоты, расположенной рядом с концом ND1, ND2, ND3 и/или ND4 напротив конца, связанного с L1 или L2.

В наиболее предпочтительном варианте реализации заместитель представляет собой пептидный или белковый заместитель и обозначается X, Y и/или Z, представляя собой простое удлинение белковой цепи, к примеру, как X - ND1 - L1 - ND2 - FLA на N-концевой области ND1, или на обоих концах, как Y - ND3 - L2 - ND4 – Z для получения комбинированной одиночной непрерывной белковой последовательности, которая может экспрессироваться в рекомбинантной системе экспрессии белка в качестве одиночной молекулы.

10 В других вариантах реализации пептидные или непептидные заместители можно соединять с функциональной группой боковой цепи аминокислоты, расположенной рядом с концом ND1, ND2, ND3 и/или ND4 напротив конца, связанного с L1 или L2, или, предпочтительно, с функциональной группой боковой цепи аминокислоты в диапазоне удлинений X, Y и/или Z, если X, Y и/или Z представляют собой пептиды или белки.

15 Кроме того, также возможно присоединение заместителя к линкеру L1 или L2. В таком случае, при рефолдинге белковой наночастицы, обладающей способностью самосборки, заместитель будет расположен во внутренней полости такой самоорганизующейся белковой наночастицы.

20 Тенденция к образованию олигомеров означает, что такие белки могут образовывать олигомеры в зависимости от условий, к примеру, при условиях денатурации они представляют собой мономеры, в то время как при физиологических условиях они могут 25 образовывать, к примеру, димеры, тримеры, тетрамеры или пентамеры. В соответствии с заранее определенными условиями они принимают одно единственное состояние олигомеризации, которое является необходимым для образования наночастиц. Тем не менее, их состояние олигомеризации можно изменять при изменяющихся условиях, к примеру, от димеров до тримеров при увеличении концентрации соли (Burkhard P. и др., 30 Protein Science 2000, 9:2294-2301) или от пентамеров к мономерам при понижении значения pH.

Архитектура строительного блока согласно Формуле (Ia), (Ib) или (II) явно отличается от вирусных капсидных белков. Вирусные капсиды состоят либо из одного единственного

белка, который образует 60 олигомеров или числа ему кратного, как, к примеру, частицы вируса гепатита В (EP 1 262 555, EP 0 201 416), или более, чем их одного белка, который подвергается процессу совместной сборки с образованием структуры вирусного капсида, который может принимать и другие геометрические формы, отличные от икосаэдра в зависимости от типа вируса (Fender P. и др., Nature Biotechnology 1997, 15:52-56). Белковые наночастицы, обладающие способностью самосборки (SAPN), согласно настоящему изобретению также явно отличаются от вирусоподобных частиц, так как они (а) сконструированы из других белков, отличных от вирусных капсидных белков, и (б) полость в середине наночастицы слишком мала для того, чтобы разместить ДНК/РНК полного вирусного генома.

Домены олигомеризации белка хорошо известны (Burkhard P. И др., Trends Cell Biol 2001, 11:82-88). База данных структуры белка RCSB-PDB (<http://www.rcsb.org/>) содержит атомные структуры белков. Данный веб-сайт предлагает инструменты для идентификации белковых олигомеров среди таких атомных структур. Применение режима расширенного поиска (<http://www.rsb.org/pdb/search/advSearch.do>) с классификатором "A5" в "Protein Stoichiometry" выгружает пентамерные домены олигомеризации белка. Применение режима расширенного поиска с классификатором "Coiled coil proteins" в "SCOP classification Browser" выгружает суперспиральные домены олигомеризации белка. Объединение двух режимов поиска выгружает все пентамерные суперспиральные белковые структуры в базе данных. Точно так же, димерные, тримерные или тетramerные суперспиральные структуры можно получить, применяя соответственно "A2", "A3" или "A4" в качестве классификаторов. В настоящем изобретении домены олигомеризации ND1, ND2, ND3 и ND4 предпочтительно представляют собой суперспиральные домены. Суперспираль представляет собой белковую последовательность с непрерывной структурой в основном гидрофобных остатков с интервалом в 3 и 4 остатка, обычно в последовательности из семи аминокислот (гептадный повтор) или одиннадцати аминокислот (ундекадный повтор), которая организуется (сворачивается) для образования мультимерной группы спиралей. Также предполагаются суперспирали с последовательностями, включающими некоторые неравномерное распределение расположенных 3 и 4 остатков. Гидрофобные остатки представляют собой в частности гидрофобные аминокислоты Val, Ile, Leu, Met, Tyr, Phe и Trp. В основном гидрофобный означает, что по меньшей мере 50% остатков должны быть выбраны из указанных гидрофобных аминокислот.

К примеру, в предпочтительном мономерном строительном блоке согласно Формуле (Ia), (Ib) или (II), ND1, ND2, ND3 и ND4 представляют собой белки любой из Формул

5	[aa(a)-aa(b)-aa(c)-aa(d)-aa(e)-aa(f)-aa(g)] <sub>x</sub>	(IIIa),
	[aa(b)-aa(c)-aa(d)-aa(e)-aa(f)-aa(g)-aa(a)] <sub>x</sub>	(IIIb),
	[aa(c)-aa(d)-aa(e)-aa(f)-aa(g)-aa(a)-aa(b)] <sub>x</sub>	(IIIc),
	[aa(d)-aa(e)-aa(f)-aa(g)-aa(a)-aa(b)-aa(c)] <sub>x</sub>	(IIId),
	[aa(e)-aa(f)-aa(g)-aa(a)-aa(b)-aa(c)-aa(d)] <sub>x</sub>	(IIIe),
10	[aa(f)-aa(g)-aa(a)-aa(b)-aa(c)-aa(d)-aa(e)] <sub>x</sub>	(IIIf),
	[aa(g)-aa(a)-aa(b)-aa(c)-aa(d)-aa(e)-aa(f)] <sub>x</sub>	(IIIg),

при этом aa означает аминокислоту или ее производное, aa(a), aa(b), aa(c), aa(d), aa(e), aa(f) и aa(g) являются одинаковыми или различными аминокислотами или их производными, 15 предпочтительно aa(a) и aa(d) являются одинаковыми или различными гидрофобными аминокислотами или их производными; и x представляет собой число между 2 и 20, предпочтительно между 3 и 10.

Гептад представляет собой гептапептид согласно Формуле aa(a)-aa(b)-aa(c)-aa(d)-aa(e)-aa(f)-aa(g) (IIIa) или любую из его перестановок согласно Формулам (IIIb) до (IIIg).

Предпочтительными являются мономерные строительные блоки согласно Формуле (Ia), (Ib) или (II), при этом все домены олигомеризации белка ND1, ND2, ND3 и ND4 представляют собой

25 (1) белок согласно любой из Формул (IIIa) до (IIIg), при этом x равен 3, а aa(a) и aa(d) выбраны из 20 природных  $\alpha$ -L-аминокислот таким образом, чтобы сумма баллов из Таблицы 1 для данных 6 аминокислот составляла по меньшей мере 14, и такие белки, содержащие вплоть до 17 дополнительных гептадов; или

30 (2) белок согласно любой из Формул (IIIa) до (IIIg), при этом x равен 3, а aa(a) и aa(d) выбраны из 20 природных  $\alpha$ -L-аминокислот таким образом, чтобы сумма баллов из Таблицы 1 для данных 6 аминокислот составляла по меньшей мере 12 при условии, что одна аминокислота aa(a) представляет собой заряженную аминокислоту, способную

образовывать внутриспиральный солевой мостик к аминокислоте aa(d) или aa(g) соседнего гептада, или что одна аминокислота aa(d) представляет собой заряженную аминокислоту, способную образовывать внутриспиральный солевой мостик к аминокислоте aa(a) или aa(e) соседнего гептада, и такие белки, содержащие вплоть до двух дополнительных гептадов.

- 5 Заряженная аминокислота, способная образовывать внутриспиральный солевой мостик к аминокислоте соседнего гептада, представляет собой, к примеру, Asp или Glu, если другая аминокислота представляет собой Lys, Arg или His, или наоборот.

Таблица 1: Баллы аминокислот для определения предпочтительности

Аминокислота	Положение aa(a)	Положение aa(d)
L (Leu)	3,5	3,8
M (Met)	3,4	3,2
I (Ile)	3,9	3,0
Y (Tyr)	2,1	1,4
F (Phe)	3,0	1,2
V (Val)	4,1	1,1
Q (Gln)	-0,1	0,5
A (Ala)	0,0	0,0
W (Trp)	0,8	-0,1
N (Asn)	0,9	-0,6
H (His)	-1,2	-0,8
T (Thr)	0,2	-1,2
K (Lys)	-0,4	-1,8
S (Ser)	-1,3	-1,8
D (Asp)	-2,5	-1,8
E (Glu)	-2,0	-2,7
R (Arg)	-0,8	-2,9
G (Gly)	-2,5	-3,6
P (Pro)	-3,0	-3,0
C (Cys)	0,2	-1,2

Кроме того, предпочтительными являются мономерные строительные блоки согласно Формуле (Ia), (Ib) или (II), при этом один или более доменов олигомеризации белка ND1, ND2, ND3 или ND4 выбраны из следующих предпочтительных белков:

(11) Белок согласно любой из Формул (Ша) до (Шг), при этом  
 aa(a) выбран из Val, Ile, Leu и Met и их производных, и  
 aa(d) выбран из Leu, Met, Val и Ile и их производных.

5    (12) Белок согласно любой из Формул (Ша) до (Шг), при этом один aa(a) представляет собой Asn и другие aa(a) выбраны из Asn, Ile и Leu, и aa(d) представляет собой Leu. Такой белок обычно представляет собой домен димеризации.

10    (13) Белок согласно любой из Формул (Ша) до (Шг), при этом aa(a) и aa(d) оба представляют собой Leu или оба Ile. Такой белок обычно представляет собой домен тримеризации.

(14) Белок согласно любой из Формул (Ша) до (Шг), при этом aa(a) и aa(d) оба представляют собой Trp. Такой белок обычно представляет собой домен пентамеризации.

15    (15) Белок согласно любой из Формул (Ша) до (Шг), при этом aa(a) и aa(d) оба представляют собой Phe. Такой белок обычно представляет собой домен тетрамеризации.

(16) Белок согласно любой из Формул (Ша) до (Шг), при этом aa(a) и aa(d) оба представляют собой либо Trp, либо Phe. Такой белок обычно представляет собой домен пентамеризации.

20    (17) Белок согласно любой из Формул (Ша) до (Шг), при этом aa(a) представляет собой либо Leu, либо Ile, и один aa(d) представляет собой Gln, и другие aa(d) выбраны из Gln, Leu и Met. Такой белок обладает способностью представлять собой домен пентамеризации.

25    Другие предпочтительные белки представляют собой белки (1), (2), (11), (12), (13), (14), (15), (16) и (17) как определено в настоящей заявке выше, и при этом также

(21) по меньшей мере один aa(g) выбран из Asp и Glu и aa(e) в следующем гептаде представляет собой Lys, Arg или His; и/или

30    (22) по меньшей мере один aa(g) выбран из Lys, Arg и His, и aa(e) в следующем гептаде представляет собой Asp или Glu, и/или

(23) по меньшей мере один aa(g) выбран из Lys, Arg и His, и aa(a до g) с интервалом 3 или 4 аминокислоты в последовательности представляет собой Asp или Glu. Такие пары аминокислот aa(a до g) представляют собой, к примеру, aa(b) и aa(e) или aa(f).

- 5 Программы прогнозирования суперспиралей, такие как PCOILS (<http://toolkit.tuebingen.mpg.de/pcoils>; Gruber M.B. и др., J. Struct. Biol. 2006, 155(2):140-5) или MULTICOIL (<http://groups.csail.mit.edu/cb/multicoil/cgi-bin/multicoil.cgi>) могут прогнозировать, какие белковые последовательности образуют суперспираль. Таким образом, в мономерном строительном блоке согласно Формуле (Ia), (Ib), или (II) ND1, ND2,
- 10 ND3 и ND4 представляют собой белки, которые содержат по крайней мере последовательность длиной в два гептад-повтора, которую прогнозируют при помощи программы прогнозирования суперспиралей PCOILS для образования суперспирали с вероятностью более, чем 0,9 для всех ее аминокислот с по меньшей мере с размерами одного из окон в 14, 21, или 28.

- 15 В более предпочтительном мономерном строительном блоке согласно Формуле (Ia), (Ib) или (II), ND1, ND2, ND3 и ND4 представляют собой белки, которые содержат по меньшей мере одну последовательность длиной в три гептад-повтора, которую прогнозируют при помощи программы прогнозирования суперспиралей PCOILS для образования суперспирали с вероятностью более, чем 0,9 для всех ее аминокислот с по меньшей мере с размерами одного из окон в 14, 21, или 28.

Известные суперспиральные последовательности можно получить из банков данных, таких как банк данных белков RCSB (<http://www.rcsb.org>).

- 25 Наиболее предпочтительными являются суперспиральные последовательности и мономерные строительные блоки, описанные в примерах.

- 30 В еще одном предпочтительном варианте реализации один домен олигомеризации ND1, ND2, ND3 или ND4 представляет собой домен тримеризации (фолдон) белка фибритина бактериофага T4 (Tao, Y. и др., Structure 1997, 5:789-798.) или его производное. Данный домен тримеризации имеет последовательность GYIPEAPRDGQAYVRKDGEVLLSTFL (SEQ ID №: 3). Небольшие модификации данного домена также предусмотрены.

- Белковые наночастицы, обладающие способностью самосборки (SAPN), образуются из мономерных строительных блоков согласно Формуле (Ia), (Ib) или смеси мономерных
- 5 строительных блоков согласно Формуле (Ia) или (Ib) с мономерными строительными блоками согласно Формуле (II). Если собираются такие строительные блоки, они образуют так называемые НОК (LCM) единицы. Число мономерных строительных блоков, которые будут собираться в такую НОК единицу, будет определяться наименьшим общим кратным (НОК). Следовательно, если, к примеру, домены олигомеризации мономерного
- 10 строительного блока образуют пентамер ( $ND1_5$ ) ( $m = 5$ ) и димер ( $ND2_2$ ) ( $n = 2$ ), то 10 мономеров будут образовывать НОК единицу. Если линкерный сегмент L обладает приемлемой длиной, данная НОК единица может собраться в виде сферической белковой наночастицы.
- 15 Белковые наночастицы, обладающей способностью самосборки (SAPN), могут самоорганизовываться посредством сборки только одной или более одной НОК единиц (Таблица 2). Такие SAPN представляют собой топологически замкнутые структуры.

### *Правильные многогранники*

- 20 Существует пять правильных многогранников, тетраэдр, куб, октаэдр, додекаэдр и икосаэдр. Они обладают различными элементами внутренней вращательной симметрии. Тетраэдр обладает одной осью второго порядка и двумя осями третьего порядка, куб и октаэдр обладают осями вращательной симметрии второго, третьего и четвертого порядка,
- 25 додекаэдр и икосаэдр обладают осями вращательной симметрии второго, третьего и пятого порядка. В кубе пространственная ориентация этих осей является точно такой же, как и в октаэдре, и также в додекаэдре и икосаэдре пространственная ориентация данных осей относительно друг друга является в точности одинаковой. Следовательно, для целей SAPN согласно настоящему изобретению додекаэдр и икосаэдр можно рассматривать как будучи
- 30 идентичными. Додекаэдр/икосаэдр построен из 60 идентичных трехмерных строительных блоков (Таблица 2). Данные строительные блоки являются асимметричными единицами (AUs) многогранника. Они представляют собой пирамиды и грани пирамиды соотносятся с одной из осей вращательной симметрии, следовательно, данные AUs будут нести на своих гранях элементы симметрии второго, третьего и пятого порядка. Если данные элементы

симметрии образуются из доменов олигомеризации белка, то такие AUs конструируются из мономерных строительных блоков, как описано выше. Достаточно выравнить два домена олигомеризации ND1 и ND2, или ND3 и ND4 вдоль двух осей симметрии AU. Если два данных домена олигомеризации образуют стабильные олигомеры, то будет автоматически 5 образовываться граница раздела симметрии вдоль третьей оси симметрии, и ее можно стабилизировать посредством оптимизации взаимодействий вдоль данной границы раздела, к примеру, гидрофобных, гидрофильных или ионных взаимодействий, или ковалентных связей, таких как дисульфидные мостики.

10 Таблица 2: Возможные комбинации состояний олигомеризации в формировании правильных многогранников

ID №	m	n	Тип многогранника	НОК	Количество четных единиц	Количество строительных блоков
1	5	2	додекаэдр/икосаэдры	10	6	60
2	5	3	додекаэдр/икосаэдры	15	4	60
3	4	3	куб/октаэдр	12	2	24
4	3	4	куб/октаэдр	12	2	24
5	3	5	додекаэдры/икосаэдры	15	4	60
6	2	5	додекаэдры/икосаэдры	10	6	60
7	5	4	нерегулярный	20	1	20
8	4	5	нерегулярный	20	1	20

*Сборка до самоорганизующихся белковых наночастиц (SAPN) с правильной симметрией многогранника*

15 Для получения самоорганизующихся белковых наночастиц (SAPN) с правильной геометрией (додекаэдр, икосаэдр, октаэдр, куб), требуется более одной НОК единицы. К примеру, чтобы образовать икосаэдр из мономера, содержащего тримерные и пентамерные домены олигомеризации, требуется 4 НОК единицы, каждая из которых состоит из 15 20 мономерных строительных блоков, т.е. белковая наночастица с правильной геометрией будет состоять из 60 мономерных строительных блоков. В Таблице 2 перечислены необходимые комбинации состояний олигомеризации двух доменов олигомеризации и количества НОК единиц для формирования двух возможных многогранников.

Будут ли НОК единицы также подвергаться сборке с образованием правильного многогранника, состоящего из более одной НОК единицы, зависит от геометрического расположения двух доменов олигомеризации ND1 и ND2 или ND3 и ND4 по отношению друг к другу, особенно от угла между осями вращательной симметрией двух доменов олигомеризации. В основном данный процесс управляет посредством i) взаимодействия между соседними доменами в наночастице, ii) длины линкерного сегмента L, iii) формы индивидуальных доменов олигомеризации. Данный угол больше в НОК единицах по сравнению с размещением в правильном многограннике. Кроме того, данный угол не идентичен в мономерных строительных блоках в отличие от правильного многогранника.

10 Если этот угол ограничен меньшими значениями правильного многогранника (с помощью привлекательных гидрофобных, гидрофильных или ионных взаимодействий, или ковалентного дисульфидного мостика между двумя доменами олигомеризации) и линкерный сегмент L является достаточно коротким, то данное число НОК единиц, каждая из которых содержит определенное количество мономерных строительных блоков, будет

15 далее дополнительно отжигаться для того, чтобы образовать правильный многогранник (Таблица 2), или включать больше мономерных строительных блоков для образования наночастиц, у которых отсутствует строгая внутренняя симметрия многогранника.

Если угол между двумя доменами олигомеризации достаточно мал (даже меньше, чем в правильном многограннике с икосаэдрической симметрией), тогда большое количество (несколько сотен) белковых цепей могут организовываться в белковую наночастицу. При такой конструкции SAPN может обладать молекулярной массой, соответствующей нескольким 60 белковым цепям архитектуры аналогичной той, что описывает теория квазиэквивалентности или мозаичная теория вирусных капсидов для "всех пентамерных" вирусных архитектур.

Предпочтительно, чтобы антигены, которые состоят из флагеллин-содержащих наночастиц, могли представлять собой или В-клеточные эпитопы и/или Т-клеточные эпитопы, и быть выбранными из группы, состоящей из (а) белков или пептидов, подходящих для индуцирования иммунной реакции против раковых клеток; (б) белков, пептидов или углеводов, подходящих для индуцирования иммунной реакции против инфекционных заболеваний; (в) белков или пептидов, подходящих для индуцирования иммунной реакции против аллергенов; (г) белковых или пептидных гормонов, подходящих для индуцирования иммунной реакции для лечения заболевания человека; и (д) молекул

гаптенов, подходящих для индуцирования иммунной реакции для лечения зависимостей или других расстройств. Белковые наночастицы, содержащие такие белки, их пептидные фрагменты, пептиды, углеводы или гаптены могут являться подходящими для индуцирования иммунной реакции у людей, или также у сельскохозяйственных и 5 домашних животных.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к мономерным строительным блокам согласно Формуле (Ia) или (Ib), как определено выше.

10 В ином аспекте настоящее изобретение относится к композиции, содержащей белковую наночастицу как описано в настоящем описании. Такая композиция является особенно подходящей в качестве вакцины. Предпочтительные вакцинные композиции содержат белковую наночастицу в водном буферном растворе и могут дополнительно содержать, к примеру, вспомогательные вещества, полученные из сахаров (такие как глицерол, 15 трегалоза, сахароза или подобные им) или вспомогательные вещества, полученные из аминокислот (такие как аргинин, пролин, глутамат или подобные им), или анионные, катионные, неионные или твиллер-ионные детергенты (такие как холат, дезоксихолат, твин или подобные им), или любой вид соли (такой как NaCl, MgCl<sub>2</sub> или подобные им) для регуляции ионной силы раствора.

20 25 В другом своем аспекте настоящее изобретение относится к способу вакцинации человека или животного, не являющегося человеком, который включает введение эффективного количества белковой наночастицы, как представлено в настоящем описании выше, субъекту, нуждающемуся в такой вакцинации.

25 *Разработка FLA-SAPN (флагеллина, содержащего самоорганизующуюся белковую наночастицу)*

Конкретный пример FLA-SAPN согласно настоящего изобретения представляет собой 30 следующие конструкции "FLA-SAPN-1a" и "FLA-SAPN-2".

T81c-WRW-8RRVRA-D0-D1 (FLJB\_SALTY)(FLA-SAPN-1a) в соответствии с Формулой (Ia)

MGHHHHHHASWRWDGGLVPRGSWQTWNARWDQWSNDWNAWRSDWQAWR  
 DDWARWRALWMGGRLLLRLLEELERRLEELERRLEELERFVAAWTLRVRALERR  
 LEELERRIEEIARGMAQVINTNSLSLLTQNNLNKSQSALGTAIERLSSGLRINSAKD  
 DAAGQAIANRFTANIKGLTQASRNANDGISIAQTTEGALNEINNNLQRVRELAQV  
 5 SANSTNSQSDLDSIQAEITQRLNEIDRVSGQTQFNGVKVLAQDNTLTIQVGANDG  
 ETIDIDLKQINSQTLGLDSLNHGAPVDPASPWTENPLQKIDAALAQVDALRSDL  
 GAVQNRFNSAITNLGNTVNNLSEARSRIEDSDYATEVSNMSRAQILQQAGTSVLA  
 QANQVPQNVLSLLR (SEQ ID №:4)

10 T81c-WRW-8RRVRA-T1BT\* (FLA-SAPN-2) в соответствии с Формулой (II)

MGHHHHHHASEYLNKIQNSLSTEWPSSVTGSWQTWNARWDQWSNDWNAWR  
 SDWQAWRDDWARWRALWMGGRLLLRLLEELERRLEELERRLEELERFVAAWTL  
 RVRALERRLEELERRIEEIARGSGDPNANPNVDPNANPNVNANPNANPNANP  
 (SEQ ID №:5)

15

Такие конструкции состоят из следующих подструктур:

X	MGHHHHHHASWRWDGGLVPRGS (SEQ ID №:6)
ND1	WQTWNARWDQWSNDWNAWRSDWQAWRDDWARWRALWM (SEQ ID №:7)
L1	GG
ND2	RLLLRLLEELERRLEELERRLEELERFVAAWTLRVRALERRLEELERRIEEI ARG (SEQ ID №:8)
FLA	MAQVINTNSLSLLTQNNLNKSQSALGTAIERLSSGLRINSAKDDAAGQAI ANRFTANIKGLTQASRNANDGISIAQTTEGALNEINNNLQRVRELAQSA NSTNSQSDLDSIQAEITQRLNEIDRVSGQTQFNGVKVLAQDNTLTIQVGA NDGETIDIDLKQINSQTLGLDSLNHGAPVDPASPWTENPLQKIDAALAQ VDALRSDLGAVQNRFNSAITNLGNTVNNLSEARSRIEDSDYATEVSNMS RAQILQQAGTSVLAQANQVPQNVLSLLR (SEQ ID №:9)
Y	MGHHHHHHASEYLNKIQNSLSTEWPSSVTGS (SEQ ID №:10)
ND3	WQTWNARWDQWSNDWNAWRSDWQAWRDDWARWRALWM (SEQ ID №:7)
L2	GG
ND4	RLLLRLLEELERRLEELERRLEELERFVAAWTLRVRALERRLEELERRIEEI ARG (SEQ ID №:8)
Z	SGDPNANPNVDPNANPNVNANPNANPNANP (SEQ ID №:11)

Для облегчения процесса очистки FLA-SPAN-1а начинается с последовательности X как определено в Формуле (Ia) или (Ib):

которая содержит гистидиновую метку для никелевой аффиной очистки и сайты рестрикции на уровне ДНК для дальнейшего субклонирования (NcoI, NdeI, BamHI).

5 Для ND1 был выбран домен пентамеризации ( $m=5$ ). Конкретная пентаметрическая суперспираль представляет собой новейшую модификацию триптофан-зипперного домена пентамеризации (Liu J. и др., Proc Natl Acad Sci U S A 2004; 101(46):16156-61, pdb-entry 1T8Z).

10 Исходный триптофан-зипперный домен пентамеризации имеет последовательность

SSNAKWDQWSSDWQTWNNAKWDQWSNDWNAWRSQDWQAWKDDWARWNQR  
WDNWAT

(SEQ ID №:12).

15 Модифицированная суперспиральная последовательность домена пентамеризации, применяемая для FLA-SAPN-1a, начинается в положении 13, заканчивается в положении 49 и содержит незначительные вариации в С-концевой области (RALWM вместо NQRWD), но сохраняя структуру гептадного повтора остатков триптофана как в исходной последовательности (SEQ ID NO: 12).

20 13-WQTWNARWDQWSNDWNAWRSQDWQAWRDDWARWRALWM-49 (SEQ ID №:7).

Далее данную последовательность удлиняют посредством короткого линкера L1 (GG) из двух остатков глицина, далее соединяют с доменом тримеризации ND2 следующей

25 последовательности, которая представляет собой чрезвычайно устойчивый суперспиральный тример:

RLLRLLEELERRLEELERFVAAWTLRVRALERRLEELERRRIEEIARG  
(SEQ ID №:8)

30 Было показано, что тример образуется даже при условиях полной денатурации ДСН-ПААГ-электрофореза (Фигура 5). Он также содержит pan-DR-связывающий HTL-эпитоп строки RFVAAWTLRVRA, который является производным от последовательности PADRE с оптимизированной тримерной суперспиральной предрасположенностью.

В FLA-SAPN-1а участок "FLA" согласно Формуле 1а состоит из доменов D0 и D1 флагеллина *Salmonella typhimurium* (как в патенте США № 8420102) со следующей последовательностью

MAQVINTNSLSLLTQNNLNKSQSALGTAIERLSSGLRINSAKDDAAGQAIANRFT  
 5 ANIKGLTQASRNANDGISIAQTTEGALNEINNNLQRVRELAVQSANSTNSQSDLDSIQAEITQRLNEIDRVSGQTQFNGVKVLAQDNTLTIQVGANDGETIDIDLKQINSQTLGLDSLNHGAPVDPASPWTENPLQKIDAALAQVDALRSDLGAVQNRFNSAITNLGNTVNNLSEARSRIEDSDYATEVSMSRAQILQQAGTSVLAQANQVPQNVLLR (SEQ ID №:9)

10 Такая конструкция далее приводит к следующей последовательности, которую применяли для экспрессии белков, очистки и проведения биофизических анализов

MGHHHHHASWRWDGGLVPRGSWQTWNARWDQWSNDWNAWRSDWQAWR  
 DDWARWRALWMGGRLLLRLLEELERRLEELERFVAAWTLRVRALERR  
 15 LEELERRIEEIARGMAQVINTNSLSLLTQNNLNKSQSALGTAIERLSSGLRINSAKDDAAGQAIANRFTANIKGLTQASRNANDGISIAQTTEGALNEINNNLQRVRELAVQSANSTNSQSDLDSIQAEITQRLNEIDRVSGQTQFNGVKVLAQDNTLTIQVGANDGETIDIDLKQINSQTLGLDSLNHGAPVDPASPWTENPLQKIDAALAQVDALRSDLGAVQNRFNSAITNLGNTVNNLSEARSRIEDSDYATEVSMSRAQILQQAGTSVLAQANQVPQNVLLR (SEQ ID №:4)

Модель мономера FLA-SAPN-1а представлена на Фигуре 1C.

Соответствующая конструкция "FLA-SAPN-2" представляет собой следующее:

25 Для облегчения процесса очистки FLA-SAPN-2 начинается с последовательности Y как определено в Формуле (II)

MGHHHHHASEYLNKIQNSLSTEWPSSVTGS (SEQ ID №:10)

которая содержит гистидиновую метку для никелевой аффиной очистки, 30 последовательность Т-клеточного эпитопа T1BT\* (Calvo-Calle J.M., Infection and immunity 2006:6929–6939) из циркумспорозитного белка CS из *Plasmodium falciparum*

EYLNKIQNSLSTEWPSSVT (SEQ ID №:13)

с одним цистеином, замененным на серин, и сайты рестрикции на уровне ДНК для дальнейшего субклонирования (NcoI, NdeI, BamHI) и, следовательно, несколько отличается от "X" в FLA-SPAN-1a.

- 5 ND3 в FLA-SPAN-2 полностью идентичен ND1 в FLA-SAPN-1a для обеспечения надлежащей совместной сборки.

13-WQTWNNAKWDQWSNDWNAWRSDWQAWKDDWARWRALWM-49 (SEQ ID №:7).

- 10 Далее данную последовательность удлиняют посредством короткого линкера L2 (GG) из двух остатков глицина, который также идентичен FLA-SAPN-1a.

Далее в FLA-SAPN-2 линкер соединяют с доменом тримеризации ND4 в следующей последовательности

RLLLRLLEELERRLEELERFVAAWTLRVRALERRLEELERRRIEEIARG  
15 (SEQ ID №:8)

которая является в точности одинаковой, как и в FLA-SAPN-1a, следовательно, кора ND1-L1-ND2 и ND3-L2-ND4 и наночастиц FLA-SAPN-1a и FLA-SAPN-2 являются полностью идентичными и обеспечивают надлежащую совместную сборку двух белковых цепей после рефолдинга.

- 20 В FLA-SAPN-2 участок "Z" согласно Формуле (II) состоит из повторяющейся области циркумспорозитного белка (CSP) *Plasmodium falciparum*, которая содержит три повтора фосфатазы N-ацетилнеуриминовой кислоты (NANP) и некоторые их модификации (DPNANPNVDPNANPNV, SEQ ID №: 14), которые обнаруживают в нативной 25 последовательности циркумспорозитного белка, и представляет собой В-клеточный эпитоп, к которому должна быть выработана иммунная реакция. Он связан с частицей посредством последовательности SG:

SGDPNANPNVDPNANPNVNANPNANPNANP (SEQ ID №:11)

- 30 Такая конструкция далее приводит к следующей последовательности, которую применяли для экспрессии белков, очистки и проведения биофизических анализов:

MGHNNHHHASEYLNKIQNSLSTEWPSSVTGSWQTWNARWDQWSNDWNAWR  
SDWQAWRDDWARWRALWMGGRLLLRLLEELERRLEELERFVAAWTL

RVRALERRLEELERRRIEEIARGSGDPNANPNVDPNANPNVNANPNANPNANP  
 (SEQ ID №:5)

Модель мономера FLA-SAPN-2 представлена на фигуре 1С.

5

Модель наночастицы, совместно собранной из FLA-SAPN-1a и FLA-SAPN-2 в соотношении 1:59 представлена на Фигуре 1С, предполагая T=1 икосаэдрическую симметрию.

10 EM-изображение совместно собранных белков FLA-SAPN-1a и FLA-SAPN-2 в соотношении 48:12 представлено на Фигуре 4.

### **Примеры**

15 Пример 1 - Клонирование

ДНК, кодирующие конструкции наночастиц, были получены с применением стандартных методик молекулярной биологии. Плазмиды, содержащие ДНК, кодирующую белковую последовательность LONG-D2-D1-ori

20 MGHHHHHNASWRWDGGLVPRGSWQTWNARWDQWSNDWNAWRSDWQAWR  
 DDWARWRALWMGGRLLLRLLEELERRLEELERFVAAWTLRVRALERR  
 LEELEERRRIEEIARGSGSSARLSDEANNAVKGESKITVNGAEYTANATGDKITLAG  
 KTMFIDKTASGVSTLINEDAAA**AKKSTANPLASIDSALKVDAVRSSLGAIQNRF**  
 DSAIGSRNANDGISIAQTTEGALNEINNNLQRVRELSVQATNGTNSDLKSIQDE  
 25 IQQRLEEIDRVSNQTQFNGVKVLSQDNQMKIQVGANDGETITIDLQKIDVKSLGL  
 DGFnVNGPKEATVGDLKSSFKNVTGYDTYAAGADKYRVDINSGAV (SEQ ID  
 №: 15)

30 были сконструированы посредством клонирования в сайты рестрикции NcoI/EcoRI основной конструкции экспрессии SAPN согласно Фигуре 3.

35 Для данной конструкции не существует этапа смешивания/совместной сборки различных конструкций. Иммуноген вакцины будет получен посредством ковалентного присоединения эпитопов вакцины, таких как никотин, на носитель с уже включенным в него производным флагеллина, предпочтительно на остатки лизина.

Данная конструкция состоит из пентамерного суперспирального триптофанового зиппера (ND1), присоединенного посредством двух остатков глицина (GG) к самостоятельно сконструированной тримерной суперспирали (ND2), которая содержит panDR-5 связывающий эпитоп CD4 строки ERFVAAWTLRVRAL (SEQ ID №:16). На N-конце она содержит гистидиновую метку и сайт расщепления тромбина (X). Архитектура кора данного X - ND1 - L1 - ND2 подробно описана выше. На С-конец прикрепляют флагеллиновую конструкцию (FLA), состоящую из доменов D1 и D2 флагеллина *Salmonella* из структуры с PDB-кодом 3V47 (банк данных белка RCSB). Остатки от 348 до 447, 10 перекрывающие участки доменов D1 и D2, связывают с остатками 24 до 214, снова охватывающими участки D1 и D2 в противоположном направлении с помощью одиночного остатка глицина. Данная конструкция скрепляет молекулы флагеллина D1 и D2 с наночастицами таким образом, что домен D1 располагается на внешней поверхности наночастицы, и TLR5-связывающий сайт подвергается воздействию на поверхности 15 наночастицы (Фигура 2а). В отличие от Фигуры 2, самостоятельно сконструированная суперспираль ND2 представляет собой тримерную суперспираль.

## Пример 2 - Экспрессия

20 Плазмиды трансформировали в клетки кишечной палочки BL21 (DE3), которые выращивали в бульоне Луриа с ампициллином при 37 °C. Экспрессию индуцировали изопропил-β-D-тиогалакто-пиранозидом. Через четыре часа после индукции, клетки убирали с 37 °C и проводили их сбор при помощи центрифугирования при 4000 x g в течение 15 мин. Клеточный осадок хранили при -20 °C. Осадок оттаивали на льду и 25 сусpendировали в буфере для лизиса, состоящего из 9 М мочевины, 100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM Трис pH 8, 20 mM имидазола и 0,2 mM трис-2-карбоксиэтилфосфина (TCEP).

30 В качестве альтернативы другие клеточные линии также можно применять для экспрессии, такие как клетки KRX. В клетках KRX экспрессию можно осуществлять с протоколом ранней аутоиндукции клеток KRX с применением предварительнойочной культуры при 37 градусах с ампициллином (100 мкг/мл) и глюкозой (0,4%). Проводили разбавление предварительныхочных культур в соотношении 1:100 в культуре для экспрессии, содержащей ампициллин (100 мкг/мл), глюкозу (0,05%) и рамнозу (0,1%) при 25 °C в течение 24 часов. Уровень экспрессии белка оценивали при помощи электрофореза с

додецилсульфатом натрия в полиакриламидном геле (ДСН-ПААГ-электрофореза), как представлено на Фигуре 5. Конструкция образует мономеры, тримеры и тетрамеры даже в условиях денатурации при ДСН-ПААГ-электрофорезе.

## 5 Пример 3 - Очистка

Лизис клеток проводили посредством разрушения их ультразвуком и лизат очищали при помощи центрифугирования при 30500 x g в течение 45 мин. Очищенный лизат инкубировали с Ni-NTA агаровыми гранулами (Qiagen, Valencia, CA, USA) в течение по 10 меньшей мере 1 часа. Колонку промывали лизирующим буфером, а затем буфером, содержащим 9 М мочевины, 500 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM Трис pH 8, 20 mM имидазола и 0,2 mM ТСЕР. Белок элюировали с градиентом pH: 9 М мочевины, 100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 20 mM цитрата, 20 mM имидазола и 0,2 mM ТСЕР. Последующие промывки проводили при pH 6,3, 15 5,9 и 4,5. Последующий градиента pH, градиент лизирующего буфера, увеличивающего эффективность действия имидазола, применяли для дальнейшего элюирования белка. Чистоту оценивали при помощи электрофореза с додецилсульфатом натрия в 20 полиакриламидном геле (ДСН-ПААГ-электрофореза) как представлено на Фигуре 5.

## Пример 4 - Рефолдинг

Для рефолдинга белок ребуферизовали при следующих условиях: 9 М мочевины, 20 mM Трис pH 8,5, 50 mM NaCl, 5% глицерина, 2 mM ЭДТА. Для быстрого рефолдинга первого скриннинга 4 мкл раствора с концентрацией 1,8 мг/мл добавляли к буферному раствору как представлено в Таблице 3 до конечной концентрации 0,05 мг/мл. Далее проводили анализ 25 раствора при помощи негативной контрастирующей просвечивающей электронной микроскопии при различных разрешениях.

Таблица 3: Буфферы, применяемые для рефолдинга LONG-D2-D1 (первый скриннинг)

№	pH	NaCl (мM)	MES (мM)	HEPES (мM)	TRIS (мM)	Глицерин (%)
1	6,5	50	20	–	–	5
2	6,5	150	20	–	–	5
3	7,5	50	–	20	–	5
4	7,5	150	–	20	–	5

5	8,5	50	–	–	20	5
6	8,5	150	–	–	20	5

MES = 2-морфолиноэтансульфоновая кислота

HEPES = 2-[4-(2-гидроксиэтил)пиперазин-1-ил]этансульфоновая кислота

TRIS = 2-амино-2-гидроксиметил-пропан-1,3-диол

5

При необходимости можно осуществить дополнительные скриннинги для оптимизации условий проведения рефолдинга с меньшими объемами выборки для pH и ионной силы. Кроме того, можно добавлять вспомогательные вещества, такие как трегалоза, сахароза, аргинин, пролин или другие, или при необходимости можно добавлять детергенты, такие как холат, дезоксихолат, Твин-80 или другие. Для LONG-D2-D1-ori никакой дополнительной оптимизации рефолдинга не требуется, и условия для рефолдинга представляли собой pH 8,5, 50 mM NaCl, 20 mM Трис, 5% глицерина. EM-изображения LONG-D2-D1-ori после рефолдинга при разных разрешениях демонстрируют хорошее образование наночастиц (Фигура 6).

15

### Пример 5 – I исследование пути активации TLR5

Агонистическую активность LONG-D2-D1-ori на Toll-подобном рецепторе 5 (TLR5) исследовали, применяя клетки TLR5/SEAPorter HEK 293 (IMGENEX, Cat. No. IML-105) и

20 оценивали EC<sub>50</sub> активного LONG-D2-D1-ori. Клеточную линию IML-105 высевали в 96-луночные планшеты в количестве 5 x 10<sup>4</sup> клеток на лунку в течение 16 часов. Клетки обрабатывали различными концентрациями (от 0,01 до 1000 нг/мл) каждого испытуемого образца, положительным контролем (флагеллин IMGENEX, Cat. No. IMG-2205) или контрольным растворителем (каждым соответствующим буфером) в двух параллелях в 25 течение 24 часов. Далее среду для культивирования клеток из каждой лунки разводили в соотношении 1:2 и переносили в 96-луночные микротитрационные планшеты в двух параллелях, в которые также в двух параллелях добавляли серийно разведенные стандарты секретируемой щелочной фосфатазы (SEAP). Чашки инкубировали при 65 °C в течение 30 мин для инактивации любой эндогенной щелочной фосфатазы. Далее субстрат фосфатазы добавляли в каждую лунку и инкубировали при комнатной температуре в течение 30 мин. Планшеты анализировали посредством считывания при 405 нм и оценки чувствительной к 30 дозе активности и оценки подготовленной EC<sub>50</sub> (Фигура 7A).

Агонистическая активность TLR5 была умеренно высокой с расчетным значением EC<sub>50</sub> 12,59 нг/мл в сравнении с 0,29 нг/мл положительного контроля флагеллина из *Salmonella typhimurium*.

5

#### **Пример 6 – II исследование пути активации TLR5**

Соединение согласно Формуле (Ia), обозначаемое T81c-WRW-8RRVRA-D0-D1 (FLJB\_SALTY):

10 MGHHHHHHASWRWDGGLVPRGSWQTWNARWDQWSNDWNAWRSDWQAWR  
DDWARWRALWMGGRLLLRLLEELERRLEELERFVAAWTLRVRALERR  
LEELERRIEEIARGMAQVINTNSLSSLTQNNLNKSQSALGTAIERLSSGLRINSAKD  
DAAGQAIANRFTANIKGLTQASRNANDGISIAQTTEGALNEINNNLQRVRELAVQ  
SANSTNSQSDLDSIQAEITQRLNEIDRVSGQTQFNGVKVLAQDNTLTIQVGANDG  
15 ETIDIDLKQINSQTLGLDSLNVHgapVDPASPWTENPLQKIDAALAQVDALRSDL  
GAVQNRFNSAITNLGNTVNNLSEARSRIEDSDYATEVSNMSRAQILQQAGTSVLA  
QANQVPQNVLSLLR (SEQ ID №:4)

Соединение согласно Формуле (II), обозначаемое T81c-WRW-8RRVRA-T1BT\* (FLA-20 SAPN-2):

MGHHHHHHASEYLNKIQNSLSTEWPSSVTGSWQTWNARWDQWSNDWNAWR  
SDWQAWRDDWARWRALWMGGRLLLRLLEELERRLEELERFVAAWTL  
RVRALERRLEELERRIEEIARGSGDPNANPNVDPNANPNVNANPNANPNANP  
(SEQ ID №:5)

25

Две данные совместно собранные цепи подробно описаны выше. Архитектура кора ND1 - L1 - ND2, которая является одинаковой в обеих Формулах (Ia) и (II), т.е. такой же, как у ND3 - L2 - ND4, является такой же, как и в Примере 1. В цепи 1 (Формула Ia) участок FLA состоит из доменов флагеллина D0 и D1, однако от другого штамма, нежели чем в Примере 30 1. Заместители Y и Z в цепи 2 представляют собой Т-клеточный эпитоп T1BT\* и последовательность длиной в 28 остатков из области повтора NANP циркумспорозитного белка из *Plasmodium falciparum* в качестве В-клеточного эпитопа.

Клонирование, экспрессия, очистка и рефолдинг двух цепей по существу соответствует протоколам, описанным в Примерах 1, 2, 3 и 4. Условиями для рефолдинга данных совместно собранных наночастиц являются pH 7,5, 50 mM NaCl, 20 mM HEPES, 5 % глицерина. ЕМ-изображение совместно собранных наночастиц представлено на Фигуре 4А.

Оценку чувствительной к дозе активности как агониста TLR5 и оценку EC<sub>50</sub> проводили в соответствии с протоколом, описанным в Пример 5. Активность агониста TLR5 была очень высокой с рассчитанным значением EC<sub>50</sub> всего лишь в 0,0901 нг/мл в сравнении с 0,29 нг/мл положительного контроля флагеллина из *Salmonella Typhimurium* (Фигура 7В). Следовательно, данные наночастицы индуцируют очень сильную активацию TLR5, которая примерно в три раза сильнее, чем у природного флагеллина, даже несмотря на то, что флагеллин-содержащие цепи присутствуют только при мольном соотношении в 12:48. Кривая дозовой активности оказывается колоколообразной кривой, следовательно, при более высокой концентрации флагеллина иммунная реакция снижается. Оптимальная концентрация находится около уровня в 50 нг/мл.

**Пример 7 – III исследование пути активации TLR5**

Соединение согласно Формуле (1а), обозначаемое PD52-2i88-PANDORA-D2-D1-ori:

20 MGHHHHHASGSWEKWNACKWDEWKNDWNDWRRDWQAWVDDWAYWTLT  
WKGELYSKLAEERRNEELERRLEELARFVAALSMRLAELERRNEELARGSGS  
SARLSDLEANNAVRGESKITVNGAEYTANATGDRITLAGRTMFIDRTASGVSTLI  
NEDAAAARRSTANPLASIDSALSRVDAVRSSLGAIQNRFDSAIGSKNANDGISIAQ  
TTEGALNEINNNLQRVRELSVQATNGTNSDSDLRSIQDEIQQRLEEIDRVSNQTQF  
25 NGVKVLSQDNQMKIQVGAKDGETITIDLQKIDVKSLGLDGFNVNGPREATVGDL  
RSSFRNVTGYDTYAAGADRYRVDINSGAV (SEQ ID №: 17)

Соединение согласно Формуле (II), обозначаемое PD52-2i88-PANDORA-Noro:

MGHHHHHASGSWEKWNACKWDEWKNDWNDWRDWQAWVDDWAYWT  
30 WKYGELYSKLAEELERRNEELERRLEELARFVAALSMRLAELERRNEELARGSGS  
TVEQKTRPFTLPNLPLSSLSNSRAPLISSMGISPNDNVQSVQFQN  
GRCTLDGRLVG  
TPVSLSHVAKIRGTSNGTVINLT  
ELDGTPFHPFEGPAPIGF  
PDLGCDWHINMTQ  
FGHSSQTQYD  
VDTTPDTFVPHLGSIQANGIGSGNYVGVL  
SWISPPSHPSGSQVDL  
W  
KIPNYGSSITEATHLAPS  
VYPPGFGEVLVFFMSKMPGPGAYNLPCLLPOEYISHL

ASEQAPTVGEAALLHYVDPDTGRNLGEFKAYPDGFLTCVPNGASSGPQLPING  
VFVFVSWVSRFYQLKPVGTAS (SEQ ID №:18)

Две данные совместно собранные цепи PD52-2i88-PANDORA-D2-D1-ori и PD52-2i88-  
5 PANDORA-Noro обладают одинаковой архитектурой кора в обеих Формулах (Ia) и (II), т.е.  
ND1 - L1 - ND2 является таким же, как и ND3 - L2 - ND4. В PD52-2i88-PANDORA-D2-D1-  
Ори (Формула Ia) участок FLA состоит из доменов флагеллина D2 и D1. Домен  
олигомеризации ND2 (или ND4 соответственно) конструируют для образования димерной  
10 суперспирали. Это важно в связи с тем, что В-клеточный эпитоп (Z), также как и форма  
флагеллина (FLA), оба представляют собой димерные белки. Соотношение совместной  
сборки составляет 5:55.

Заместители Y и Z в PD52-2i88-PANDORA-Noro (Формула II) представляют собой  
гистидиновую метку и последовательность длиной в 298 остатков из Р-белка норовируса,  
15 связанную с ND4 посредством линкера GSGS соответственно. Данная последовательность  
соответствует Р2-субдомену норовируса Hu/1968/US (Jiang X. и др., Virology 1993;  
195(1):51-61) с соответствующим кодом pdb-ввода 1НМ для рентгеновской  
кристаллической структуры. Она содержит остатки 223 до 520, которые представляют  
собой домен Р (у которого отсутствует 10 С-концевых остатков 521-530, так как 10 данных  
20 остатков разупорядочены в рентгеновской кристаллической структуре и являются в  
значительной степени положительно заряженными) плюс 3 аминокислоты С-концевой  
области домена S согласно номенклатуре, представленной Prasad B.V.V. и др., Science 1999;  
286:287-290. Остаток треонина 223 тщательно выбирали при помощи программ  
компьютерной визуализации для того, чтобы он служил точкой присоединения к пого-  
25 SAPN, потому как она представляет собой наиболее близкую точку соприкосновения  
между участками поперек оси второго порядка в кристаллической структуре вирусного  
капсида.

Клонирование, экспрессия, очистка и рефолдинг двух цепей по существу соответствуют  
протоколам, описанным в Примерах 1, 2, 3 и 4. Условиями для рефолдинга данных  
30 совместно собранных наночастиц являются pH 6,8 80 mM NaCl, 20 mM MES, 5 % глицерина.  
EM-изображение совместно собранных наночастиц (в соотношении 5:55) представлено на  
Фигуре 4С.

Оценку чувствительной к дозе активности как агониста TLR5 и оценку EC<sub>50</sub> проводили согласно протоколу, описанному в Примере 5. Активность агониста TLR5 была умеренно высокой с рассчитанным значением EC<sub>50</sub> всего лишь 17,66 нг/мл в сравнении с 0,29 нг/мл положительного контроля флагеллина из *Salmonella Typhimurium* (Фигура 7C).

5

### Пример 8 – *Иммуногенность I*

Соединение согласно Формуле (Ia), обозначаемое T81c-8-D0-D1 (Eurogentec 0):

MGHHHHHASWKWDGLVPRGSWQTWNNAKWDQWSNDWNAAWRSDWQAWK  
 10 DDWARWALWMGGRLLRLEELERRLEELAKFVAAWTLKAAA VDLELAALRR  
 RLEELARGNTNSLSSLTQNNLNKSQSALGTAIERLSSGLRINSAKDDAAGQAIAN  
 RFTANIKGLTQASRNANDGISIAQTTEGALNEINNNLQRVRELA VQSANSTNSQS  
 15 DLDISIQAEITQRLNEIDRVSGQTQFNGVKVLAQDNTLTIQVGANDGETIDIDLKQI  
 NSQLGLDGGENPLQKIDAALAQVDTLRSIDLGA VQNRFNSAITNLGNTVNNLTS  
 VRSRIEDSDYATEVSNMSRAQILQQAGTSVLAQANQVPQN (SEQ ID №:19)

Соединение согласно Формуле (II), обозначаемое T81c-8-Pf:

MGHHHHHASWKWDGLVPRGSWQTWNNAKWDQWSNDWNAAWRSDWQAWK  
 20 DDWARLALLMGGRLLRLEELERRLEELAKFVAAWTLKAAA VDLELAALRRR  
 LEELARGGSGANANPNANPNANPNANP (SEQ ID №:20)

Две данные совместно собранные цепи являются подобными тем, которые описаны в Примере 6. Там отсутствует Т-клеточный эпитоп T1BT\* в Y, и В-клеточный эпитоп из области повторения CS белка из *Plasmodium falciparum* в Z имеет длину всего лишь в 16 остатков. Примерная суперспираль (ND2 и ND4) содержит panDR-связывающий эпитоп PADRE. В цепи 1 (Формула Ia) участок FLA состоит из доменов флагеллина D0 (остатки от 6 до 171) и D1 (остатки от 229 до 312), однако из фазы I варианта C150 среднего домена флагеллина *Salmonella enterica* подвида *enterica serovar Typhimurium*, который опять-таки представляет собой иной штамм, нежели чем в примерах 1 и 6. D0 и D1 соединяют при помощи двух остатков глицина.

Клонирование, экспрессия, очистка и рефолдинг двух цепей по существу соответствуют протоколам, описанным в Примерах 1, 2, 3 и 4. Условиями для рефолдинга данного типа совместно собранных наночастиц являются pH 8,5, 50 мМ NaCl, 20 мМ Трис, 5 %

глицерина. ЕМ-изображение совместно собранных наночастиц в соотношении 3:57 представлено на Фигуре 4В.

Иммунизацию групп из семи мышей C57BL/6 осуществляли внутрибрюшинно либо 10 мкг, 5 либо 1 мкг тремя инъекциями каждые две недели. Иммуногены представляли собой либо только T81c-8-Pf (Формула II), либо совместную сборку T81c-8-D0-D1 (Формула Ia) и T81c-8-Pf (Формула II) в двух различных соотношениях совместной сборки 3:57 и 9:51. Другими словами - предполагая T1-икосаэдрическую симметрию наночастиц – присутствовали три различных иммуногена, которые содержали либо ноль, либо три, либо девять молекул D0-10 D1 на наночастицу. Титр антител после третьей инъекции определяли при помощи ИФА, что представлено на Фигуре 8А. Предполагали предельное значение параметра иммунной реакции с 1 мкг при соотношении совместной сборки в 3:57 (что соответствует в общей сложности примерно 20 нг флагеллина), повышающее титр антител примерно в девять раз по сравнению с наночастицами без доменов D0-D1. Доза выше 10 мкг при соотношении 15 совместной сборки в 9:51 (что соответствует в общей сложности приблизительно 2 мкг флагеллина) фактически несколько снижает иммунную реакцию по сравнению с наночастицами без доменов D0-D1.

### Пример 9 – *Иммуногенность II*

Соединение согласно Формуле (Ia), обозначаемое DIM-D0-D1 (Eurogentec 1):  
 MGHHHHHASGSWEENARWDEWENDWNDWREDWQAWRDDWARWRATW  
 MGGRLLSRLERLERRNEELRRLLQLLRNRLERLAQFVRALSMQNAELERRLEEL  
 ARGMAQVINTNSLSSLTQNNLNKSQSALGTAIERLSSGLRINSAKDDAAGQAIAN  
 RFTANIKGLTQASRNANDGISIAQTTEGALNEINNNLQRVRELAQVQSANSTNSQS  
 DLDSIQAEITQRLNEIDRVSGQTQFNGVKVLAQDNTLTIQVGANDGETIDIDLKQI  
 NSQTLGLDSLNVHGAPVDPASPWTENPLQKIDAALAQVDALRSDLGAVQNRFNS  
 AITNLGNTVNNLSEARSRIEDSDYATEVSMSRAQILQQAGTSVLAQANQVPQN  
 VLSLLR  
 (SEQ ID №:21)

Соединение согласно Формуле (II), обозначаемое DIM-D2-D1-tip3\_NIC-pept:

MGHHHHHASGSWEENARWDEWENDWNDWREDWQAWRDDWARWRATW  
 MGGRLLSRLERLERRNEELRRLLQLLRNRLERLAQFVRALSMQNAELERRLEEL

ARGSGSSARLSDEANNAVRGESKITVNGAEYTANATGDRITLAGRTMFIDRTAS  
 GVSTLINEDAAAARRSTANPLASIDSALSRVDAVRSSLGAIQNRFDASKAKKKDG  
 KDDKDSKNANDGISIAQTTEGALNEINNNLQRVRELSVQATNGTNSSDLRSIQD  
 EIQQRLEEDRVSNQTQFNGVKVLSQDNQMKIQVGAKDGETITIDLQKIDVKSLG  
 5 LDGFNVNGPREATVGDLRSSFRNVTGYDTYAAGADRYRVDINSGAV (SEQ ID  
 №:22)

Согласно Примеру 5 и Примеру 6 производное флагеллина скорее всего будет более иммуногенным в форме D0-D1, чем в форме D2-D1. Поэтому форму D0-D1 можно 10 применять в качестве агониста TLR5 для повышения иммуногенности иммуногена, который несет форму D2-D1 флагеллина. Следовательно, в данном примере последовательность D0-D1

MAQVINTNSLSLLTQNNLNKSQSALGTAIERLSSGLRINSAKDDAAGQAIANRFT  
 ANIKGLTQASRNANDGISIAQTTEGALNEINNNLQRVRELAVQSANSTNSQSDL  
 15 SIQAEITQRLNEIDRVSGQTQFNGVKVLAQDNTLTIQVGANDGETIDIDLKQINSQ  
 TLGLDSLNVH GAPVDPASPWTENPLQKIDAALAQVDALRSDLGAVQNRFNSAIT  
 NLGNTVNNLSEARSRIEDSDYATEVSMSRAQILQQAGTSVLAQANQVPQNVLS  
 LLR (SEQ ID №:23)

20 соответствует “FLA” в Формуле (Ia), в то время как последовательность D2-D1-tip3

SARLSDEANNAVRGESKITVNGAEYTANATGDRITLAGRTMFIDRTASGVSTLI  
 NEDAAAARRSTANPLASIDSALSRVDAVRSSLGAIQNRFDASKAKKKDGKDDKD  
 SKNANDGISIAQTTEGALNEINNNLQRVRELSVQATNGTNSSDLRSIQDEIQQRL  
 EEIDRVSNQTQFNGVKVLSQDNQMKIQVGAKDGETITIDLQKIDVKSLGLDFNV  
 25 NGPREATVGDLRSSFRNVTGYDTYAAGADRYRVDINSGAV (SEQ ID №:24)

соответствует “Z” в Формуле (II). Данная последовательность “Z” в D2-D1-tip3 30 представляет собой модификацию флагеллина, в котором домен D2 скомбинирован с доменом D1 флагеллина как это описано выше. Кроме того, белковую подложку D2-D1-Tip3 применяют в качестве носителя для отображения антигена никотина. Для того, чтобы допустить ковалентное связывание активированного никотина с белковой подложкой, боковые цепи лизина, которые не экспонированы на поверхность, подвергают мутированию до аргининов, в то время как аргинины, которые экспонированы на поверхность, подвергают мутированию до лизинов. После ковалентного присоединения

активированного никотина к первичным аминам белковой последовательности, далее никотин располагается на поверхности наночастицы. Более того, для того, чтобы расположить молекулы никотина на внешней поверхности наночастиц, белок D2-D1 осуществляет перенос так называемой последовательности "tip3" KAKKKDGKDDKD (SEQ

5 ID №: 25) на наиболее экспонированный участок молекулы (рис 2A), которая содержит высокую плотность лизинов, следовательно, ковалентное связывание никотина с боковыми цепями лизина будет обеспечивать то, что молекулы никотина с высокой плотностью располагаются на поверхности наночастицы.

10 Кор DIM-D0-D1 и DIM-D2-D1-tip3\_NIC-pept (т.е. ND1-L1-ND2 и ND3-L2-ND4) является идентичным, и, в частности, домены олигомеризации ND2 и ND4 соответственно сконструированы для образования димерных суперспиралей. Это позволяет располагать молекулу флагеллина (в любой форме) в качестве димера, готового взаимодействовать с димерным TL5-рецептором (Фигура 2B).

15 Клонирование, экспрессия, очистка и рефолдинг двух цепей по существу соответствует протоколам, описанным в Примерах 1, 2, 3 и 4. Условиями для рефолдинга для данного типа совместно собранных наночастиц являются pH 7,0, 50 mM NaCl, 20 mM HEPES, 5 % глицерина. EM-изображение совместно собранных наночастиц в соотношении 5:55  
20 представлено на Фигуре 4D.

Иммунизацию групп из семи мышей C57Bl/6 осуществляли внутрибрюшинно 10 мкг в трех инъекциях каждые две недели. Иммуногены представляли собой либо совместную сборку DIM-D0-D1 (Формула Ia) и DIM-D2-D1-tip3\_NIC-pept (Формула II) в соотношении 25 совместной сборки 5:55, либо стандартный носитель гемоцианин фиссуреллы (KLH), к которому прикрепляли аналогичную активированную молекулу никотина. KLH представляет собой большой, мультисубъединичный, переносящий кислород металлопротеин, обнаруживаемый в гемолимфе *Megathura crenulata* часто применяемый в качестве носителя для антигенов в экспериментах по иммунизации. Титр антител после 30 третьей инъекции определяли при помощи ИФА, что представлено на Фигуре 8В. Титр антител наночастиц иммуногена данного типа с TLR5-агонистом значительно увеличен по сравнению с титром стандартного носителя KLH, располагающего тот же самый антиген (никотин) на своей поверхности.

### Пример 10 – Иммуногенность III

Соединение согласно Формуле (Ia), обозначаемое DEDDL:

MGDKHHHHHKDGSDKGSWEWNARWDEWENDWNDWREDWQAWRDDWA  
 5 RWRATWMGGRLSRLERLERRNEELRRLLQLLRNRLERLAQFVRALSMQNAEL  
 ERRLEELARGMAQVINTNSLSLLTQNNLNRSQSALGTAIERLSSGLRINSARDDA  
 AGQAIANRFTANIRGLTQASRNANDGISIAQTTEGALNEINNNLQRVRELAVQSA  
 NSTNSQSDLDSIQAEITQRLNEIDRVSGQTQFNGVRVLAQDNTLTIQVGANDGETI  
 10 DIDLRQINSQTLGLDQLNVQQKYKDGDKGDDKTENPLQRIDAALAQVDALRSDL  
 GAVQNRFNSAITNLGNTVNNLSEARSRIEDSDYATEVSNMSRAQILQQAGTSVLA  
 QANQVPQNVLSLLR (SEQ ID №:26)

Данная белковая цепь наночастицы содержит такой же "FLA" модифицированный домен из фазы I варианта C150 среднего домена флагеллина *Salmonella enterica* подвида *enterica serovar Typhimurium*, как и в Примере 8. Все остатки лизина в данной последовательности заменяют на аргинин. Домены D0 и D1 соединяют посредством аминокислотной последовательностью KYKDGDKGDDK (SEQ ID №: 1), которая содержит четыре лизина в качестве связующих сайтов для ковалентного присоединения молекул.

20 Примерная суперспираль (ND2) содержит panDR-связывающую последовательность ELRRLLQLLRNRLERLAQFVRALSMQNA (SEQ ID №:27). Заместитель "X" содержит гистидиновую метку шести аминокислот и трех остатков лизина, примерно равномерно распределенных по всей последовательности для ковалентного присоединения молекул. N-конец также является подходящим для ковалентного присоединения, например, при 25 помощи химии сложного эфира N-гидроксисукцинида (НГС).

Клонирование, экспрессия и очистка белковой цепи по существу соответствует протоколам, описанным в Примерах 1, 2 и 3.

30 Предварительно до замены буфера для реакции связывания, объединенные фракции элюции из аффинной очистки инкубировали с 5 мМ ЭДТА по меньшей мере в течение часа для связывания в хелатный комплекс любых возможных выщелоченных ионов никеля. Далее буфер заменяли, применяя обессоливающую колонку HiPrep 26/10. Колонку уравновешивали следующим связывающим буфером: 6 М гуанидингидрохлорида, 150 мМ

NaCl, 20 мМ HEPES pH 7,2 в объеме пяти колонок с последующим связыванием образца в колонке. Стадию элюирования проводили связующим буфером в объеме двух колонок.

Связывание НГС-никотина (N-гидроксисукциниimidный эфир никотиновой кислоты) проводили в мольном соотношении 1:50 (DEDDEL : НГС-никотин) с 11,1 мг белка (2,5 мл объема), что соответствует 0,24 мкмоль белка. НГС-никотин (5 мг) растворяли в 150 мкл 100% ДМСО, что соответствует 12,8 мкмоль. Для 50-кратного молярного избытка НГС-никотина, добавляли к белку 141 мкл данного раствора НГС-никотина, что соответствует 12 мкмоль. Реакцию связывания инкубировали в течение 3-х часов в темноте (покрывали алюминиевой фольгой) и перемешивали при помощи магнитной мешалки.

На следующем этапе замены буфера для того, чтобы удалить несвязанный НГС-никотин и заменить буфер на буфер предварительного рефолдинга, заполненную колонку PD minitrap G-25 применяли для ребуферизации в следующих условиях: 8 М мочевины, 20 мМ Трис pH 8,5, 150 мМ NaCl и 10% трегалозы.

Рефолдинг белковой цепи по существу соответствует протоколу, описанному в Примере 4. В частности, 8 мг связанного белка Nic-DEDDEL (белок DEDDEL, соединенный с никотином, 2,4 мл белкового раствора 3,35 мг/мл) по каплям добавляли к 158,4 мл буфера рефолдинга (20 мМ HEPES pH 7,0, 150 мМ NaCl, 10% трегалозы) при перемешивании. Добивались конечной концентрации белка в 0,05 мг/мл. Реакцию рефолдинга проводили в течение 10 минут общего времени. Наночастицы Nic-DEDDEL после рефолдинга представлены на Фигуре 9.

Иммунизацию групп из трех 6 мышей C57Bl/6 осуществляли подкожно либо 10 мкг Nic-DEDDEL, либо 10 мкг Nic-KLH (никотин, соединенный с гемоцианином фиссуреллы) в качестве положительного контроля в трех инъекций каждая с недельным перерывом. Титр антител в нулевой день (т.е. до первой инъекции) и далее неделю спустя после каждой инъекции (день 7, 14 и 21) определяли при помощи ИФА, что представлено на Фигуре 10. Данные эксперименты показывают высокую иммуногенность Nic-DEDDEL с более чем 30-кратно лучшей индукцией антител по сравнению с Nic-KLH. Пиковые значения только после 3 вакцинаций находятся в титрах, близких к 163840.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> Альфа-О Пептидс АГ

<120> Флагеллин-содержащие белковые наночастицы в качестве платформы для вакцины

<130> P3091PC00

<160> 32

<170> PatentIn версия 3.5

<210> 1

<211> 11

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая конструкция

<400> 1

Lys Tyr Lys Asp Gly Asp Lys Gly Asp Asp Lys  
1 5 10

<210> 2

<211> 11

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая конструкция

<400> 2

Lys Leu Lys Leu Leu Leu Leu Lys Leu Lys  
1 5 10

<210> 3

<211> 27

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая конструкция

<400> 3

Gly Tyr Ile Pro Glu Ala Pro Arg Asp Gly Gln Ala Tyr Val Arg Lys  
1 5 10 15

Asp Gly Glu Trp Val Leu Leu Ser Thr Phe Leu  
20 25

<210> 4

<211> 392

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая конструкция

<400> 4

Met Gly His His His His Ala Ser Trp Arg Trp Asp Gly Gly  
1 5 10 15

Leu Val Pro Arg Gly Ser Trp Gln Thr Trp Asn Ala Arg Trp Asp Gln  
20 25 30

Trp Ser Asn Asp Trp Asn Ala Trp Arg Ser Asp Trp Gln Ala Trp Arg  
35 40 45

Asp Asp Trp Ala Arg Trp Arg Ala Leu Trp Met Gly Gly Arg Leu Leu  
50 55 60

Leu Arg Leu Glu Glu Leu Glu Arg Arg Leu Glu Glu Leu Glu Arg Arg  
65 70 75 80

Leu Glu Glu Leu Glu Arg Phe Val Ala Ala Trp Thr Leu Arg Val Arg  
85 90 95

Ala Leu Glu Arg Arg Leu Glu Glu Leu Glu Arg Arg Ile Glu Glu Ile  
100 105 110

Ala Arg Gly Met Ala Gln Val Ile Asn Thr Asn Ser Leu Ser Leu Leu  
115 120 125

Thr Gln Asn Asn Leu Asn Lys Ser Gln Ser Ala Leu Gly Thr Ala Ile  
130 135 140

Glu Arg Leu Ser Ser Gly Leu Arg Ile Asn Ser Ala Lys Asp Asp Ala  
145 150 155 160

Ala Gly Gln Ala Ile Ala Asn Arg Phe Thr Ala Asn Ile Lys Gly Leu  
165 170 175

Thr Gln Ala Ser Arg Asn Ala Asn Asp Gly Ile Ser Ile Ala Gln Thr  
180 185 190

Thr Glu Gly Ala Leu Asn Glu Ile Asn Asn Asn Leu Gln Arg Val Arg  
195 200 205

Glu Leu Ala Val Gln Ser Ala Asn Ser Thr Asn Ser Gln Ser Asp Leu  
210 215 220

Asp Ser Ile Gln Ala Glu Ile Thr Gln Arg Leu Asn Glu Ile Asp Arg  
225 230 235 240

Val Ser Gly Gln Thr Gln Phe Asn Gly Val Lys Val Leu Ala Gln Asp  
245 250 255

Asn Thr Leu Thr Ile Gln Val Gly Ala Asn Asp Gly Glu Thr Ile Asp  
260 265 270

Ile Asp Leu Lys Gln Ile Asn Ser Gln Thr Leu Gly Leu Asp Ser Leu  
275 280 285

Asn Val His Gly Ala Pro Val Asp Pro Ala Ser Pro Trp Thr Glu Asn  
290 295 300

Pro Leu Gln Lys Ile Asp Ala Ala Leu Ala Gln Val Asp Ala Leu Arg  
305 310 315 320

Ser Asp Leu Gly Ala Val Gln Asn Arg Phe Asn Ser Ala Ile Thr Asn  
325 330 335

Leu Gly Asn Thr Val Asn Asn Leu Ser Glu Ala Arg Ser Arg Ile Glu  
340 345 350

Asp Ser Asp Tyr Ala Thr Glu Val Ser Asn Met Ser Arg Ala Gln Ile  
355 360 365

Leu Gln Gln Ala Gly Thr Ser Val Leu Ala Gln Ala Asn Gln Val Pro  
370 375 380

Gln Asn Val Leu Ser Leu Leu Arg  
385 390

<210> 5  
<211> 155  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Синтетическая конструкция

<400> 5

Met Gly His His His His His Ala Ser Glu Tyr Leu Asn Lys Ile  
1 5 10 15

Gln Asn Ser Leu Ser Thr Glu Trp Ser Pro Ser Ser Val Thr Gly Ser  
20 25 30

Trp Gln Thr Trp Asn Ala Arg Trp Asp Gln Trp Ser Asn Asp Trp Asn  
35 40 45

Ala Trp Arg Ser Asp Trp Gln Ala Trp Arg Asp Asp Trp Ala Arg Trp

50

55

60

Arg Ala Leu Trp Met Gly Gly Arg Leu Leu Leu Arg Leu Glu Glu Leu  
65 70 75 80

Glu Arg Arg Leu Glu Glu Leu Glu Arg Arg Leu Glu Glu Leu Glu Arg  
85 90 95

Phe Val Ala Ala Trp Thr Leu Arg Val Arg Ala Leu Glu Arg Arg Leu  
100 105 110

Glu Glu Leu Glu Arg Arg Ile Glu Glu Ile Ala Arg Gly Ser Gly Asp  
115 120 125

Pro Asn Ala Asn Pro Asn Val Asp Pro Asn Ala Asn Pro Asn Val Asn  
130 135 140

Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro  
145 150 155

<210> 6  
<211> 22  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Синтетическая конструкция

<400> 6

Met Gly His His His His His Ala Ser Trp Arg Trp Asp Gly Gly  
1 5 10 15

Leu Val Pro Arg Gly Ser  
20

<210> 7  
<211> 37  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Синтетическая конструкция

<400> 7

Trp Gln Thr Trp Asn Ala Arg Trp Asp Gln Trp Ser Asn Asp Trp Asn  
1 5 10 15

Ala Trp Arg Ser Asp Trp Gln Ala Trp Arg Asp Asp Trp Ala Arg Trp  
20 25 30

Arg Ala Leu Trp Met

<210> 8  
<211> 54  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Синтетическая конструкция

<400> 8

Arg Leu Leu Leu Arg Leu Glu Glu Leu Glu Arg Arg Leu Glu Glu Leu  
 1 5 10 15

Arg Val Arg Ala Leu Glu Arg Arg Leu Glu Glu Leu Glu Arg Arg Ile  
35 40 45

Glu Glu Ile Ala Arg Gly  
50

<210> 9  
<211> 277  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Синтетическая конструкция

<400> 9

Met	Ala	Gln	Val	Ile	Asn	Thr	Asn	Ser	Leu	Ser	Leu	Leu	Thr	Gln	Asn
1					5					10				15	

Asn Leu Asn Lys Ser Gln Ser Ala Leu Gly Thr Ala Ile Glu Arg Leu  
20 25 30

Ser Ser Gly Leu Arg Ile Asn Ser Ala Lys Asp Asp Ala Ala Gly Gln  
35 40 45

Ala Ile Ala Asn Arg Phe Thr Ala Asn Ile Lys Gly Leu Thr Gln Ala  
50 55 60

Ser Arg Asn Ala Asn Asp Gly Ile Ser Ile Ala Gln Thr Thr Glu Gly  
65 70 75 80

Ala Leu Asn Glu Ile Asn Asn Asn Leu Gln Arg Val Arg Glu Leu Ala  
85 90 95

Val Gln Ser Ala Asn Ser Thr Asn Ser Gln Ser Asp Leu Asp Ser Ile

100 105 110

Gln Ala Glu Ile Thr Gln Arg Leu Asn Glu Ile Asp Arg Val Ser Gly  
115 120 125

Gln Thr Gln Phe Asn Gly Val Lys Val Leu Ala Gln Asp Asn Thr Leu  
130 135 140

Thr Ile Gln Val Gly Ala Asn Asp Gly Glu Thr Ile Asp Ile Asp Leu  
145 150 155 160

Lys Gln Ile Asn Ser Gln Thr Leu Gly Leu Asp Ser Leu Asn Val His  
165 170 175

Gly Ala Pro Val Asp Pro Ala Ser Pro Trp Thr Glu Asn Pro Leu Gln  
180 185 190

Lys Ile Asp Ala Ala Leu Ala Gln Val Asp Ala Leu Arg Ser Asp Leu  
195 200 205

Gly Ala Val Gln Asn Arg Phe Asn Ser Ala Ile Thr Asn Leu Gly Asn  
210 215 220

Thr Val Asn Asn Leu Ser Glu Ala Arg Ser Arg Ile Glu Asp Ser Asp  
225 230 235 240

Tyr Ala Thr Glu Val Ser Asn Met Ser Arg Ala Gln Ile Leu Gln Gln  
245 250 255

Ala Gly Thr Ser Val Leu Ala Gln Ala Asn Gln Val Pro Gln Asn Val  
260 265 270

Leu Ser Leu Leu Arg  
275

<210> 10  
<211> 32  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Синтетическая конструкция

<400> 10

Met Gly His His His His Ala Ser Glu Tyr Leu Asn Lys Ile  
1 5 10 15

Gln Asn Ser Leu Ser Thr Glu Trp Ser Pro Ser Ser Val Thr Gly Ser  
20 25 30

<210> 11  
<211> 30  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Синтетическая конструкция

<400> 11

Ser Gly Asp Pro Asn Ala Asn Pro Asn Val Asp Pro Asn Ala Asn Pro  
1 5 10 15

Asn Val Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro  
20 25 30

<210> 12  
<211> 53  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Синтетическая конструкция

<400> 12

Ser Ser Asn Ala Lys Trp Asp Gln Trp Ser Ser Asp Trp Gln Thr Trp  
1 5 10 15

Asn Ala Lys Trp Asp Gln Trp Ser Asn Asp Trp Asn Ala Trp Arg Ser  
20 25 30

Asp Trp Gln Ala Trp Lys Asp Asp Trp Ala Arg Trp Asn Gln Arg Trp  
35 40 45

Asp Asn Trp Ala Thr  
50

<210> 13  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Синтетическая конструкция

<400> 13

Glu Tyr Leu Asn Lys Ile Gln Asn Ser Leu Ser Thr Glu Trp Ser Pro  
1 5 10 15

Ser Ser Val Thr  
20

<210> 14

<211> 16  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Синтетическая конструкция

<400> 14

Asp Pro Asn Ala Asn Pro Asn Val Asp Pro Asn Ala Asn Pro Asn Val  
1 5 10 15

<210> 15  
<211> 368  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Синтетическая конструкция

<400> 15

Met Gly His His His His His Ala Ser Trp Arg Trp Asp Gly Gly  
1 5 10 15

Leu Val Pro Arg Gly Ser Trp Gln Thr Trp Asn Ala Arg Trp Asp Gln  
20 25 30

Trp Ser Asn Asp Trp Asn Ala Trp Arg Ser Asp Trp Gln Ala Trp Arg  
35 40 45

Asp Asp Trp Ala Arg Trp Arg Ala Leu Trp Met Gly Gly Arg Leu Leu  
50 55 60

Leu Arg Leu Glu Glu Leu Glu Arg Arg Leu Glu Glu Leu Glu Arg Arg  
65 70 75 80

Leu Glu Glu Leu Glu Arg Phe Val Ala Ala Trp Thr Leu Arg Val Arg  
85 90 95

Ala Leu Glu Arg Arg Leu Glu Glu Leu Glu Arg Arg Ile Glu Glu Ile  
100 105 110

Ala Arg Gly Ser Gly Ser Ser Ala Arg Leu Ser Asp Leu Glu Ala Asn  
115 120 125

Asn Ala Val Lys Gly Glu Ser Lys Ile Thr Val Asn Gly Ala Glu Tyr  
130 135 140

Thr Ala Asn Ala Thr Gly Asp Lys Ile Thr Leu Ala Gly Lys Thr Met  
145 150 155 160

Phe Ile Asp Lys Thr Ala Ser Gly Val Ser Thr Leu Ile Asn Glu Asp

	165	170	175
Ala Ala Ala Ala Lys Lys Ser Thr Ala Asn Pro Leu Ala Ser Ile Asp			
180	185	190	
Ser Ala Leu Ser Lys Val Asp Ala Val Arg Ser Ser Leu Gly Ala Ile			
195	200	205	
Gln Asn Arg Phe Asp Ser Ala Ile Gly Ser Arg Asn Ala Asn Asp Gly			
210	215	220	
Ile Ser Ile Ala Gln Thr Thr Glu Gly Ala Leu Asn Glu Ile Asn Asn			
225	230	235	240
Asn Leu Gln Arg Val Arg Glu Leu Ser Val Gln Ala Thr Asn Gly Thr			
245	250	255	
Asn Ser Asp Ser Asp Leu Lys Ser Ile Gln Asp Glu Ile Gln Gln Arg			
260	265	270	
Leu Glu Glu Ile Asp Arg Val Ser Asn Gln Thr Gln Phe Asn Gly Val			
275	280	285	
Lys Val Leu Ser Gln Asp Asn Gln Met Lys Ile Gln Val Gly Ala Asn			
290	295	300	
Asp Gly Glu Thr Ile Thr Ile Asp Leu Gln Lys Ile Asp Val Lys Ser			
305	310	315	320
Leu Gly Leu Asp Gly Phe Asn Val Asn Gly Pro Lys Glu Ala Thr Val			
325	330	335	
Gly Asp Leu Lys Ser Ser Phe Lys Asn Val Thr Gly Tyr Asp Thr Tyr			
340	345	350	
Ala Ala Gly Ala Asp Lys Tyr Arg Val Asp Ile Asn Ser Gly Ala Val			
355	360	365	

<210> 16  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Синтетическая конструкция

<400> 16

Glu Arg Phe Val Ala Ala Trp Thr Leu Arg Val Arg Ala Leu  
1 5 10

<210> 17  
<211> 351  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Синтетическая конструкция

<400> 17

Met Gly His His His His Ala Ser Gly Ser Trp Glu Lys Trp  
1 5 10 15

Asn Ala Lys Trp Asp Glu Trp Lys Asn Asp Trp Asn Asp Trp Arg Arg  
20 25 30

Asp Trp Gln Ala Trp Val Asp Asp Trp Ala Tyr Trp Thr Leu Thr Trp  
35 40 45

Lys Tyr Gly Glu Leu Tyr Ser Lys Leu Ala Glu Leu Glu Arg Arg Asn  
50 55 60

Glu Glu Leu Glu Arg Arg Leu Glu Glu Leu Ala Arg Phe Val Ala Ala  
65 70 75 80

Leu Ser Met Arg Leu Ala Glu Leu Glu Arg Arg Asn Glu Glu Leu Ala  
85 90 95

Arg Gly Ser Gly Ser Ser Ala Arg Leu Ser Asp Leu Glu Ala Asn Asn  
100 105 110

Ala Val Arg Gly Glu Ser Lys Ile Thr Val Asn Gly Ala Glu Tyr Thr  
115 120 125

Ala Asn Ala Thr Gly Asp Arg Ile Thr Leu Ala Gly Arg Thr Met Phe  
130 135 140

Ile Asp Arg Thr Ala Ser Gly Val Ser Thr Leu Ile Asn Glu Asp Ala  
145 150 155 160

Ala Ala Ala Arg Arg Ser Thr Ala Asn Pro Leu Ala Ser Ile Asp Ser  
165 170 175

Ala Leu Ser Arg Val Asp Ala Val Arg Ser Ser Leu Gly Ala Ile Gln  
180 185 190

Asn Arg Phe Asp Ser Ala Ile Gly Ser Lys Asn Ala Asn Asp Gly Ile  
195 200 205

Ser Ile Ala Gln Thr Thr Glu Gly Ala Leu Asn Glu Ile Asn Asn Asn

210

215

220

Leu Gln Arg Val Arg Glu Leu Ser Val Gln Ala Thr Asn Gly Thr Asn  
225 230 235 240

Ser Asp Ser Asp Leu Arg Ser Ile Gln Asp Glu Ile Gln Gln Arg Leu  
245 250 255

Glu Glu Ile Asp Arg Val Ser Asn Gln Thr Gln Phe Asn Gly Val Lys  
260 265 270

Val Leu Ser Gln Asp Asn Gln Met Lys Ile Gln Val Gly Ala Lys Asp  
275 280 285

Gly Glu Thr Ile Thr Ile Asp Leu Gln Lys Ile Asp Val Lys Ser Leu  
290 295 300

Gly Leu Asp Gly Phe Asn Val Asn Gly Pro Arg Glu Ala Thr Val Gly  
305 310 315 320

Asp Leu Arg Ser Ser Phe Arg Asn Val Thr Gly Tyr Asp Thr Tyr Ala  
325 330 335

Ala Gly Ala Asp Arg Tyr Arg Val Asp Ile Asn Ser Gly Ala Val  
340 345 350

<210> 18

<211> 399

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая конструкция

<400> 18

Met Gly His His His His His Ala Ser Gly Ser Trp Glu Lys Trp  
1 5 10 15

Asn Ala Lys Trp Asp Glu Trp Lys Asn Asp Trp Asn Asp Trp Arg Arg  
20 25 30

Asp Trp Gln Ala Trp Val Asp Asp Trp Ala Tyr Trp Thr Leu Thr Trp  
35 40 45

Lys Tyr Gly Glu Leu Tyr Ser Lys Leu Ala Glu Leu Glu Arg Arg Asn  
50 55 60

Glu Glu Leu Glu Arg Arg Leu Glu Leu Ala Arg Phe Val Ala Ala  
65 70 75 80

Leu Ser Met Arg Leu Ala Glu Leu Glu Arg Arg Asn Glu Glu Leu Ala  
85 90 95

Arg Gly Ser Gly Ser Thr Val Glu Gln Lys Thr Arg Pro Phe Thr Leu  
100 105 110

Pro Asn Leu Pro Leu Ser Ser Leu Ser Asn Ser Arg Ala Pro Leu Pro  
115 120 125

Ile Ser Ser Met Gly Ile Ser Pro Asp Asn Val Gln Ser Val Gln Phe  
130 135 140

Gln Asn Gly Arg Cys Thr Leu Asp Gly Arg Leu Val Gly Thr Thr Pro  
145 150 155 160

Val Ser Leu Ser His Val Ala Lys Ile Arg Gly Thr Ser Asn Gly Thr  
165 170 175

Val Ile Asn Leu Thr Glu Leu Asp Gly Thr Pro Phe His Pro Phe Glu  
180 185 190

Gly Pro Ala Pro Ile Gly Phe Pro Asp Leu Gly Gly Cys Asp Trp His  
195 200 205

Ile Asn Met Thr Gln Phe Gly His Ser Ser Gln Thr Gln Tyr Asp Val  
210 215 220

Asp Thr Thr Pro Asp Thr Phe Val Pro His Leu Gly Ser Ile Gln Ala  
225 230 235 240

Asn Gly Ile Gly Ser Gly Asn Tyr Val Gly Val Leu Ser Trp Ile Ser  
245 250 255

Pro Pro Ser His Pro Ser Gly Ser Gln Val Asp Leu Trp Lys Ile Pro  
260 265 270

Asn Tyr Gly Ser Ser Ile Thr Glu Ala Thr His Leu Ala Pro Ser Val  
275 280 285

Tyr Pro Pro Gly Phe Gly Glu Val Leu Val Phe Phe Met Ser Lys Met  
290 295 300

Pro Gly Pro Gly Ala Tyr Asn Leu Pro Cys Leu Leu Pro Gln Glu Tyr  
305 310 315 320

Ile Ser His Leu Ala Ser Glu Gln Ala Pro Thr Val Gly Glu Ala Ala  
325 330 335

Leu Leu His Tyr Val Asp Pro Asp Thr Gly Arg Asn Leu Gly Glu Phe  
340 345 350

Lys Ala Tyr Pro Asp Gly Phe Leu Thr Cys Val Pro Asn Gly Ala Ser  
355 360 365

Ser Gly Pro Gln Gln Leu Pro Ile Asn Gly Val Phe Val Phe Val Ser  
370 375 380

Trp Val Ser Arg Phe Tyr Gln Leu Lys Pro Val Gly Thr Ala Ser  
385 390 395

<210> 19

<211> 360

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая конструкция

<400> 19

Met Gly His His His His His Ala Ser Trp Lys Trp Asp Gly Gly  
1 5 10 15

Leu Val Pro Arg Gly Ser Trp Gln Thr Trp Asn Ala Lys Trp Asp Gln  
20 25 30

Trp Ser Asn Asp Trp Asn Ala Trp Arg Ser Asp Trp Gln Ala Trp Lys  
35 40 45

Asp Asp Trp Ala Arg Trp Arg Ala Leu Trp Met Gly Gly Arg Leu Leu  
50 55 60

Leu Arg Leu Glu Glu Leu Glu Arg Arg Leu Glu Glu Leu Ala Lys Phe  
65 70 75 80

Val Ala Ala Trp Thr Leu Lys Ala Ala Ala Val Asp Leu Glu Leu Ala  
85 90 95

Ala Leu Arg Arg Arg Leu Glu Glu Leu Ala Arg Gly Asn Thr Asn Ser  
100 105 110

Leu Ser Leu Leu Thr Gln Asn Asn Leu Asn Lys Ser Gln Ser Ala Leu  
115 120 125

Gly Thr Ala Ile Glu Arg Leu Ser Ser Gly Leu Arg Ile Asn Ser Ala  
130 135 140

Lys Asp Asp Ala Ala Gly Gln Ala Ile Ala Asn Arg Phe Thr Ala Asn

145 150 155 160

Ile Lys Gly Leu Thr Gln Ala Ser Arg Asn Ala Asn Asp Gly Ile Ser  
165 170 175

Ile Ala Gln Thr Thr Glu Gly Ala Leu Asn Glu Ile Asn Asn Asn Leu  
180 185 190

Gln Arg Val Arg Glu Leu Ala Val Gln Ser Ala Asn Ser Thr Asn Ser  
195 200 205

Gln Ser Asp Leu Asp Ser Ile Gln Ala Glu Ile Thr Gln Arg Leu Asn  
210 215 220

Glu Ile Asp Arg Val Ser Gly Gln Thr Gln Phe Asn Gly Val Lys Val  
225 230 235 240

Leu Ala Gln Asp Asn Thr Leu Thr Ile Gln Val Gly Ala Asn Asp Gly  
245 250 255

Glu Thr Ile Asp Ile Asp Leu Lys Gln Ile Asn Ser Gln Thr Leu Gly  
260 265 270

Leu Asp Gly Gly Glu Asn Pro Leu Gln Lys Ile Asp Ala Ala Leu Ala  
275 280 285

Gln Val Asp Thr Leu Arg Ser Asp Leu Gly Ala Val Gln Asn Arg Phe  
290 295 300

Asn Ser Ala Ile Thr Asn Leu Gly Asn Thr Val Asn Asn Leu Thr Ser  
305 310 315 320

Val Arg Ser Arg Ile Glu Asp Ser Asp Tyr Ala Thr Glu Val Ser Asn  
325 330 335

Met Ser Arg Ala Gln Ile Leu Gln Gln Ala Gly Thr Ser Val Leu Ala  
340 345 350

Gln Ala Asn Gln Val Pro Gln Asn  
355 360

<210> 20

<211> 128

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая конструкция

<400> 20

Met Gly His His His His Ala Ser Trp Lys Trp Asp Gly Gly  
1 5 10 15

Leu Val Pro Arg Gly Ser Trp Gln Thr Trp Asn Ala Lys Trp Asp Gln  
20 25 30

Trp Ser Asn Asp Trp Asn Ala Trp Arg Ser Asp Trp Gln Ala Trp Lys  
35 40 45

Asp Asp Trp Ala Arg Leu Arg Ala Leu Leu Met Gly Gly Arg Leu Leu  
50 55 60

Leu Arg Leu Glu Glu Leu Glu Arg Arg Leu Glu Glu Leu Ala Lys Phe  
65 70 75 80

Val Ala Ala Trp Thr Leu Lys Ala Ala Ala Val Asp Leu Glu Leu Ala  
85 90 95

Ala Leu Arg Arg Arg Leu Glu Glu Leu Ala Arg Gly Gly Ser Gly Ala  
100 105 110

Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro  
115 120 125

<210> 21

<211> 382

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая конструкция

<400> 21

Met Gly His His His His Ala Ser Gly Ser Trp Glu Glu Trp  
1 5 10 15

Asn Ala Arg Trp Asp Glu Trp Glu Asn Asp Trp Asn Asp Trp Arg Glu  
20 25 30

Asp Trp Gln Ala Trp Arg Asp Asp Trp Ala Arg Trp Arg Ala Thr Trp  
35 40 45

Met Gly Gly Arg Leu Leu Ser Arg Leu Glu Arg Leu Glu Arg Arg Asn  
50 55 60

Glu Glu Leu Arg Arg Leu Leu Gln Leu Leu Arg Asn Arg Leu Glu Arg  
65 70 75 80

Leu Ala Gln Phe Val Arg Ala Leu Ser Met Gln Asn Ala Glu Leu Glu

85

90

95

Arg Arg Leu Glu Glu Leu Ala Arg Gly Met Ala Gln Val Ile Asn Thr  
100 105 110

Asn Ser Leu Ser Leu Leu Thr Gln Asn Asn Leu Asn Lys Ser Gln Ser  
115 120 125

Ala Leu Gly Thr Ala Ile Glu Arg Leu Ser Ser Gly Leu Arg Ile Asn  
130 135 140

Ser Ala Lys Asp Asp Ala Ala Gly Gln Ala Ile Ala Asn Arg Phe Thr  
145 150 155 160

Ala Asn Ile Lys Gly Leu Thr Gln Ala Ser Arg Asn Ala Asn Asp Gly  
165 170 175

Ile Ser Ile Ala Gln Thr Thr Glu Gly Ala Leu Asn Glu Ile Asn Asn  
180 185 190

Asn Leu Gln Arg Val Arg Glu Leu Ala Val Gln Ser Ala Asn Ser Thr  
195 200 205

Asn Ser Gln Ser Asp Leu Asp Ser Ile Gln Ala Glu Ile Thr Gln Arg  
210 215 220

Leu Asn Glu Ile Asp Arg Val Ser Gly Gln Thr Gln Phe Asn Gly Val  
225 230 235 240

Lys Val Leu Ala Gln Asp Asn Thr Leu Thr Ile Gln Val Gly Ala Asn  
245 250 255

Asp Gly Glu Thr Ile Asp Ile Asp Leu Lys Gln Ile Asn Ser Gln Thr  
260 265 270

Leu Gly Leu Asp Ser Leu Asn Val His Gly Ala Pro Val Asp Pro Ala  
275 280 285

Ser Pro Trp Thr Glu Asn Pro Leu Gln Lys Ile Asp Ala Ala Leu Ala  
290 295 300

Gln Val Asp Ala Leu Arg Ser Asp Leu Gly Ala Val Gln Asn Arg Phe  
305 310 315 320

Asn Ser Ala Ile Thr Asn Leu Gly Asn Thr Val Asn Asn Leu Ser Glu  
325 330 335

Ala Arg Ser Arg Ile Glu Asp Ser Asp Tyr Ala Thr Glu Val Ser Asn

340

345

350

Met Ser Arg Ala Gln Ile Leu Gln Gln Ala Gly Thr Ser Val Leu Ala  
355 360 365

Gln Ala Asn Gln Val Pro Gln Asn Val Leu Ser Leu Leu Arg  
370 375 380

<210> 22

<211> 368

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая конструкция

<400> 22

Met Gly His His His His His Ala Ser Gly Ser Trp Glu Glu Trp  
1 5 10 15

Asn Ala Arg Trp Asp Glu Trp Glu Asn Asp Trp Asn Asp Trp Arg Glu  
20 25 30

Asp Trp Gln Ala Trp Arg Asp Asp Trp Ala Arg Trp Arg Ala Thr Trp  
35 40 45

Met Gly Gly Arg Leu Leu Ser Arg Leu Glu Arg Leu Glu Arg Arg Asn  
50 55 60

Glu Glu Leu Arg Arg Leu Leu Gln Leu Leu Arg Asn Arg Leu Glu Arg  
65 70 75 80

Leu Ala Gln Phe Val Arg Ala Leu Ser Met Gln Asn Ala Glu Leu Glu  
85 90 95

Arg Arg Leu Glu Glu Leu Ala Arg Gly Ser Gly Ser Ser Ala Arg Leu  
100 105 110

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

Val Asn Gly Ala Glu Tyr Thr Ala Asn Ala Thr Gly Asp Arg Ile Thr  
130 135 140

Leu Ala Gly Arg Thr Met Phe Ile Asp Arg Thr Ala Ser Gly Val Ser  
145 150 155 160

Thr Leu Ile Asn Glu Asp Ala Ala Ala Arg Arg Ser Thr Ala Asn  
165 170 175

Pro Leu Ala Ser Ile Asp Ser Ala Leu Ser Arg Val Asp Ala Val Arg  
180 185 190

Ser Ser Leu Gly Ala Ile Gln Asn Arg Phe Asp Ser Ala Lys Ala Lys  
195 200 205

Lys Lys Asp Gly Lys Asp Asp Lys Asp Ser Lys Asn Ala Asn Asp Gly  
210 215 220

Ile Ser Ile Ala Gln Thr Thr Glu Gly Ala Leu Asn Glu Ile Asn Asn  
225 230 235 240

Asn Leu Gln Arg Val Arg Glu Leu Ser Val Gln Ala Thr Asn Gly Thr  
245 250 255

Asn Ser Asp Ser Asp Leu Arg Ser Ile Gln Asp Glu Ile Gln Gln Arg  
260 265 270

Leu Glu Glu Ile Asp Arg Val Ser Asn Gln Thr Gln Phe Asn Gly Val  
275 280 285

Lys Val Leu Ser Gln Asp Asn Gln Met Lys Ile Gln Val Gly Ala Lys  
290 295 300

Asp Gly Glu Thr Ile Thr Ile Asp Leu Gln Lys Ile Asp Val Lys Ser  
305 310 315 320

Leu Gly Leu Asp Gly Phe Asn Val Asn Gly Pro Arg Glu Ala Thr Val  
325 330 335

Gly Asp Leu Arg Ser Ser Phe Arg Asn Val Thr Gly Tyr Asp Thr Tyr  
340 345 350

Ala Ala Gly Ala Asp Arg Tyr Arg Val Asp Ile Asn Ser Gly Ala Val  
355 360 365

<210> 23

<211> 277

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая конструкция

<400> 23

Met Ala Gln Val Ile Asn Thr Asn Ser Leu Ser Leu Leu Thr Gln Asn  
1 5 10 15

Asn Leu Asn Lys Ser Gln Ser Ala Leu Gly Thr Ala Ile Glu Arg Leu

20

25

30

Ser Ser Gly Leu Arg Ile Asn Ser Ala Lys Asp Asp Ala Ala Gly Gln  
35 40 45

Ala Ile Ala Asn Arg Phe Thr Ala Asn Ile Lys Gly Leu Thr Gln Ala  
50 55 60

Ser Arg Asn Ala Asn Asp Gly Ile Ser Ile Ala Gln Thr Thr Glu Gly  
65 70 75 80

Ala Leu Asn Glu Ile Asn Asn Leu Gln Arg Val Arg Glu Leu Ala  
85 90 95

Val Gln Ser Ala Asn Ser Thr Asn Ser Gln Ser Asp Leu Asp Ser Ile  
100 105 110

Gln Ala Glu Ile Thr Gln Arg Leu Asn Glu Ile Asp Arg Val Ser Gly  
115 120 125

Gln Thr Gln Phe Asn Gly Val Lys Val Leu Ala Gln Asp Asn Thr Leu  
130 135 140

Thr Ile Gln Val Gly Ala Asn Asp Gly Glu Thr Ile Asp Ile Asp Leu  
145 150 155 160

Lys Gln Ile Asn Ser Gln Thr Leu Gly Leu Asp Ser Leu Asn Val His  
165 170 175

Gly Ala Pro Val Asp Pro Ala Ser Pro Trp Thr Glu Asn Pro Leu Gln  
180 185 190

Lys Ile Asp Ala Ala Leu Ala Gln Val Asp Ala Leu Arg Ser Asp Leu  
195 200 205

Gly Ala Val Gln Asn Arg Phe Asn Ser Ala Ile Thr Asn Leu Gly Asn  
210 215 220

Thr Val Asn Asn Leu Ser Glu Ala Arg Ser Arg Ile Glu Asp Ser Asp  
225 230 235 240

Tyr Ala Thr Glu Val Ser Asn Met Ser Arg Ala Gln Ile Leu Gln Gln  
245 250 255

Ala Gly Thr Ser Val Leu Ala Gln Ala Asn Gln Val Pro Gln Asn Val  
260 265 270

Leu Ser Leu Leu Arg

<210> 24  
<211> 260  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Синтетическая конструкция

<400> 24

Ser Ala Arg Leu Ser Asp Leu Glu Ala Asn Asn Ala Val Arg Gly Glu  
1 5 10 15

Ser Lys Ile Thr Val Asn Gly Ala Glu Tyr Thr Ala Asn Ala Thr Gly  
20 25 30

Asp Arg Ile Thr Leu Ala Gly Arg Thr Met Phe Ile Asp Arg Thr Ala  
35 40 45

Ser Gly Val Ser Thr Leu Ile Asn Glu Asp Ala Ala Ala Ala Arg Arg  
50 55 60

Ser Thr Ala Asn Pro Leu Ala Ser Ile Asp Ser Ala Leu Ser Arg Val  
65 70 75 80

Asp Ala Val Arg Ser Ser Leu Gly Ala Ile Gln Asn Arg Phe Asp Ser  
85 90 95

Ala Lys Ala Lys Lys Asp Gly Lys Asp Asp Lys Asp Ser Lys Asn  
100 105 110

Ala Asn Asp Gly Ile Ser Ile Ala Gln Thr Thr Glu Gly Ala Leu Asn  
115 120 125

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

Thr Asn Gly Thr Asn Ser Asp Ser Asp Leu Arg Ser Ile Gln Asp Glu  
145 150 155 160

Ile Gln Gln Arg Leu Glu Glu Ile Asp Arg Val Ser Asn Gln Thr Gln  
165 170 175

Phe Asn Gly Val Lys Val Leu Ser Gln Asp Asn Gln Met Lys Ile Gln  
180 185 190

Val Gly Ala Lys Asp Gly Glu Thr Ile Thr Ile Asp Leu Gln Lys Ile  
195 200 205

Asp Val Lys Ser Leu Gly Leu Asp Gly Phe Asn Val Asn Gly Pro Arg  
210 215 220

Glu Ala Thr Val Gly Asp Leu Arg Ser Ser Phe Arg Asn Val Thr Gly  
225 230 235 240

Tyr Asp Thr Tyr Ala Ala Gly Ala Asp Arg Tyr Arg Val Asp Ile Asn  
245 250 255

Ser Gly Ala Val  
260

<210> 25

<211> 12

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая конструкция

<400> 25

Lys Ala Lys Lys Lys Asp Gly Lys Asp Asp Lys Asp  
1 5 10

<210> 26

<211> 390

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая конструкция

<400> 26

Met Gly Asp Lys His His His His His Lys Asp Gly Ser Asp Lys  
1 5 10 15

Gly Ser Trp Glu Glu Trp Asn Ala Arg Trp Asp Glu Trp Glu Asn Asp  
20 25 30

Trp Asn Asp Trp Arg Glu Asp Trp Gln Ala Trp Arg Asp Asp Trp Ala  
35 40 45

Arg Trp Arg Ala Thr Trp Met Gly Gly Arg Leu Leu Ser Arg Leu Glu  
50 55 60

Arg Leu Glu Arg Arg Asn Glu Glu Leu Arg Arg Leu Leu Gln Leu Leu  
65 70 75 80

Arg Asn Arg Leu Glu Arg Leu Ala Gln Phe Val Arg Ala Leu Ser Met  
85 90 95

Gln Asn Ala Glu Leu Glu Arg Arg Leu Glu Glu Leu Ala Arg Gly Met  
100 105 110

Ala Gln Val Ile Asn Thr Asn Ser Leu Ser Leu Leu Thr Gln Asn Asn  
115 120 125

Leu Asn Arg Ser Gln Ser Ala Leu Gly Thr Ala Ile Glu Arg Leu Ser  
130 135 140

Ser Gly Leu Arg Ile Asn Ser Ala Arg Asp Asp Ala Ala Gly Gln Ala  
145 150 155 160

Ile Ala Asn Arg Phe Thr Ala Asn Ile Arg Gly Leu Thr Gln Ala Ser  
165 170 175

Arg Asn Ala Asn Asp Gly Ile Ser Ile Ala Gln Thr Thr Glu Gly Ala  
180 185 190

Leu Asn Glu Ile Asn Asn Asn Leu Gln Arg Val Arg Glu Leu Ala Val  
195 200 205

Gln Ser Ala Asn Ser Thr Asn Ser Gln Ser Asp Leu Asp Ser Ile Gln  
210 215 220

Ala Glu Ile Thr Gln Arg Leu Asn Glu Ile Asp Arg Val Ser Gly Gln  
225 230 235 240

Thr Gln Phe Asn Gly Val Arg Val Leu Ala Gln Asp Asn Thr Leu Thr  
245 250 255

Ile Gln Val Gly Ala Asn Asp Gly Glu Thr Ile Asp Ile Asp Leu Arg  
260 265 270

Gln Ile Asn Ser Gln Thr Leu Gly Leu Asp Gln Leu Asn Val Gln Gln  
275 280 285

Lys Tyr Lys Asp Gly Asp Lys Gly Asp Asp Lys Thr Glu Asn Pro Leu  
290 295 300

Gln Arg Ile Asp Ala Ala Leu Ala Gln Val Asp Ala Leu Arg Ser Asp  
305 310 315 320

Leu Gly Ala Val Gln Asn Arg Phe Asn Ser Ala Ile Thr Asn Leu Gly  
325 330 335

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

Asp Tyr Ala Thr Glu Val Ser Asn Met Ser Arg Ala Gln Ile Leu Gln  
355 360 365

Gln Ala Gly Thr Ser Val Leu Ala Gln Ala Asn Gln Val Pro Gln Asn  
370 375 380

Val Leu Ser Leu Leu Arg  
385 390

<210> 27  
<211> 28  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Синтетическая конструкция

<400> 27

Glu Leu Arg Arg Leu Leu Gln Leu Leu Arg Asn Arg Leu Glu Arg Leu  
1 5 10 15

Ala Gln Phe Val Arg Ala Leu Ser Met Gln Asn Ala  
20 25

<210> 28  
<211> 279  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Синтетическая конструкция

<400> 28

Met Ala Gln Val Ile Asn Thr Asn Ser Leu Ser Leu Leu Thr Gln Asn  
1 5 10 15

Asn Leu Asn Arg Ser Gln Ser Ala Leu Gly Thr Ala Ile Glu Arg Leu  
20 25 30

Ser Ser Gly Leu Arg Ile Asn Ser Ala Arg Asp Asp Ala Ala Gly Gln  
35 40 45

Ala Ile Ala Asn Arg Phe Thr Ala Asn Ile Arg Gly Leu Thr Gln Ala  
50 55 60

Ser Arg Asn Ala Asn Asp Gly Ile Ser Ile Ala Gln Thr Thr Glu Gly  
65 70 75 80

Ala Leu Asn Glu Ile Asn Asn Leu Gln Arg Val Arg Glu Leu Ala  
85 90 95

Val Gln Ser Ala Asn Ser Thr Asn Ser Gln Ser Asp Leu Asp Ser Ile  
100 105 110

Gln Ala Glu Ile Thr Gln Arg Leu Asn Glu Ile Asp Arg Val Ser Gly  
115 120 125

Gln Thr Gln Phe Asn Gly Val Arg Val Leu Ala Gln Asp Asn Thr Leu  
130 135 140

Thr Ile Gln Val Gly Ala Asn Asp Gly Glu Thr Ile Asp Ile Asp Leu  
145 150 155 160

Arg Gln Ile Asn Ser Gln Thr Leu Gly Leu Asp Gln Leu Asn Val Gln  
165 170 175

Gln Lys Tyr Lys Asp Gly Asp Lys Gly Asp Asp Lys Thr Glu Asn Pro  
180 185 190

Leu Gln Arg Ile Asp Ala Ala Leu Ala Gln Val Asp Ala Leu Arg Ser  
195 200 205

Asp Leu Gly Ala Val Gln Asn Arg Phe Asn Ser Ala Ile Thr Asn Leu  
210 215 220

Gly Asn Thr Val Asn Asn Leu Ser Glu Ala Arg Ser Arg Ile Glu Asp  
225 230 235 240

Ser Asp Tyr Ala Thr Glu Val Ser Asn Met Ser Arg Ala Gln Ile Leu  
245 250 255

Gln Gln Ala Gly Thr Ser Val Leu Ala Gln Ala Asn Gln Val Pro Gln  
260 265 270

Asn Val Leu Ser Leu Leu Arg  
275

<210> 29

<211> 13

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая конструкция

<400> 29

Lys Ala Lys Lys Lys Asp Gly Lys Asp Asp Lys Asp Ser  
1 5 10

<210> 30

<211> 260  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Синтетическая конструкция

<400> 30

Ser Ala Arg Leu Ser Asp Leu Glu Ala Asn Asn Ala Val Arg Gly Glu  
1 5 10 15

Ser Lys Ile Thr Val Asn Gly Ala Glu Tyr Thr Ala Asn Ala Thr Gly  
20 25 30

Asp Arg Ile Thr Leu Ala Gly Arg Thr Met Phe Ile Asp Arg Thr Ala  
35 40 45

Ser Gly Val Ser Thr Leu Ile Asn Glu Asp Ala Ala Ala Arg Arg  
50 55 60

Ser Thr Ala Asn Pro Leu Ala Ser Ile Asp Ser Ala Leu Ser Arg Val  
65 70 75 80

Asp Ala Val Arg Ser Ser Leu Gly Ala Ile Gln Asn Arg Phe Asp Ser  
85 90 95

Ala Lys Ala Lys Lys Lys Asp Gly Lys Asp Asp Lys Asp Ser Lys Asn  
100 105 110

Ala Asn Asp Gly Ile Ser Ile Ala Gln Thr Thr Glu Gly Ala Leu Asn  
115 120 125

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

Thr Asn Gly Thr Asn Ser Asp Ser Asp Leu Arg Ser Ile Gln Asp Glu  
145 150 155 160

Ile Gln Gln Arg Leu Glu Glu Ile Asp Arg Val Ser Asn Gln Thr Gln  
165 170 175

Phe Asn Gly Val Lys Val Leu Ser Gln Asp Asn Gln Met Lys Ile Gln  
180 185 190

Val Gly Ala Lys Asp Gly Glu Thr Ile Thr Ile Asp Leu Gln Lys Ile  
195 200 205

Asp Val Lys Ser Leu Gly Leu Asp Gly Phe Asn Val Asn Gly Pro Arg  
210 215 220

Glu Ala Thr Val Gly Asp Leu Arg Ser Ser Phe Arg Asn Val Thr Gly  
225                    230                    235                    240

Tyr Asp Thr Tyr Ala Ala Gly Ala Asp Arg Tyr Arg Val Asp Ile Asn  
245                    250                    255

Ser Gly Ala Val  
260

<210> 31  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Синтетическая конструкция

<400> 31

Gly Lys Asp Gly Lys Asp Gly Ser  
1                    5

<210> 32  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Синтетическая конструкция

<400> 32

Gly Lys Asp Gly Lys Asp Gly Lys Asp Gly Lys Asp Gly Ser  
1                    5                    10

44  
**Формула изобретения**

1. Белковая наночастица, обладающая способностью самосборки, которая состоит из агрегатов множества строительных блоков Формулы (Ia) или (Ib)

$$X - ND1 - L1 - ND2 - FLA \text{ (Ia)} \quad \text{или} \quad FLA - ND1 - L1 - ND2 - X \text{ (Ib)},$$

состоящих из непрерывной цепи, содержащей домен олигомеризации белка ND1, линкер L1, домен олигомеризации белка ND2, производное флагеллина FLA и дополнительный заместитель X, при этом:

ND1 представляет собой белок, который образует олигомеры  $(ND1)_m$  из m субъединиц ND1, ND2 представляет собой белок, который образует олигомеры  $(ND2)_n$  из n субъединиц ND2, каждое m и n представляет собой число от 2 до 10 при условии, что m не равно n и не кратно n, и n не кратно m,

L1 представляет собой связь или короткий гибкий линкер,

FLA представляет собой флагеллин или производное флагеллина, у которого отсутствуют части последовательности аминокислот флагеллина и/или у которого от 1 до 20 аминокислот, заменены другими аминокислотами, и/или дополнительно содержащее антиген, связанный непосредственно или связанный через линкер, содержащий от 1 до 20 аминокислот;

X отсутствует или представляет собой последовательность пептида или белка, содержащую от 1 до 1000 аминокислот;

необязательно собранную совместно с множеством строительных блоков Формулы (II),

$$Y - ND3 - L2 - ND4 - Z \quad (\text{II}),$$

состоящих из непрерывной цепи, содержащей домен олигомеризации белка ND3, линкер L2, домен олигомеризации белка ND4 и дополнительные заместители Y и Z, при этом:

ND3 представляет собой белок, который образует олигомеры  $(ND3)_y$  из y субъединиц ND3, ND4 представляет собой белок, который образует олигомеры  $(ND4)_z$  из z субъединиц ND4, каждое y и z представляет собой число от 2 до 10 при условии, что y не равно z и не кратно z, и z не кратно y, и при этом,

либо ND3 идентичен ND1, либо ND4 идентичен ND2, или оба ND3 и ND4 идентичны ND1 и ND2, соответственно,

L2 представляет собой связь или короткий гибкий линкер, который может отличаться от L1 или быть идентичен L1, и Y и Z независимо друг от друга отсутствуют или представляют собой последовательность пептида или белка, содержащую от 1 до 1000 аминокислот.

2. Белковая наночастица по п.1, состоящая из агрегатов множества строительных блоков Формулы (Ia) или (Ib)



собранных совместно с множеством строительных блоков Формулы (II)



3. Белковая наночастица по п.1, в которой по меньшей мере один из ND1 и ND2 и по меньшей мере один из ND3 и ND4 представляют собой суперспираль.

4. Белковая наночастица по любому из пп. 1-3, отличающаяся тем, что по меньшей мере один из X, Y и Z является представляющим интерес антигеном.

5. Белковая наночастица по любому из пп. 1-4, отличающаяся тем, что FLA представляет собой производное флагеллина, у которого отсутствуют домены флагеллина D2 и D3.

6. Белковая наночастица по любому из пп. 1-5, отличающаяся тем, что FLA представляет собой производное флагеллина, которое содержит представляющий интерес антиген .

7. Белковая наночастица по любому из пп. 1-6, отличающаяся тем, что n в строительном блоке Формулы (Ia) или m в строительном блоке Формулы (Ib) равно 2.

8. Белковая наночастица по п. 7, отличающаяся тем, что FLA через часть D2 флагеллина связан с доменом олигомеризации ND2 Формулы (Ia), при этом n равно 2, или с доменом олигомеризации ND1 в Формуле (Ib), при этом m равно 2.

9. Белковая наночастица по любому из пп. 1-8, отличающаяся тем, что по меньшей мере один из ND1, ND2, ND3 и ND4 представляет собой суперспираль.

10. Белковая наночастица по любому из пп. 1-9, отличающаяся тем, что по меньшей мере один из ND1, ND2, ND3 и ND4 представляет собой домен тримеризации белка фибритина бактериофага T4.

11. Композиция, содержащая белковую наночастицу по любому из пп. 1-10.

12. Мономерный строительный блок Формулы (Ia) или (Ib)

X – ND1 – L1 – ND2 – FLA (Ia)    или    FLA – ND1 – L1 – ND2 – X (Ib),

состоящий из непрерывной цепи, содержащей домен олигомеризации белка ND1, линкер L1, домен олигомеризации белка ND2, производное флагеллина FLA и дополнительный заместитель X, при этом

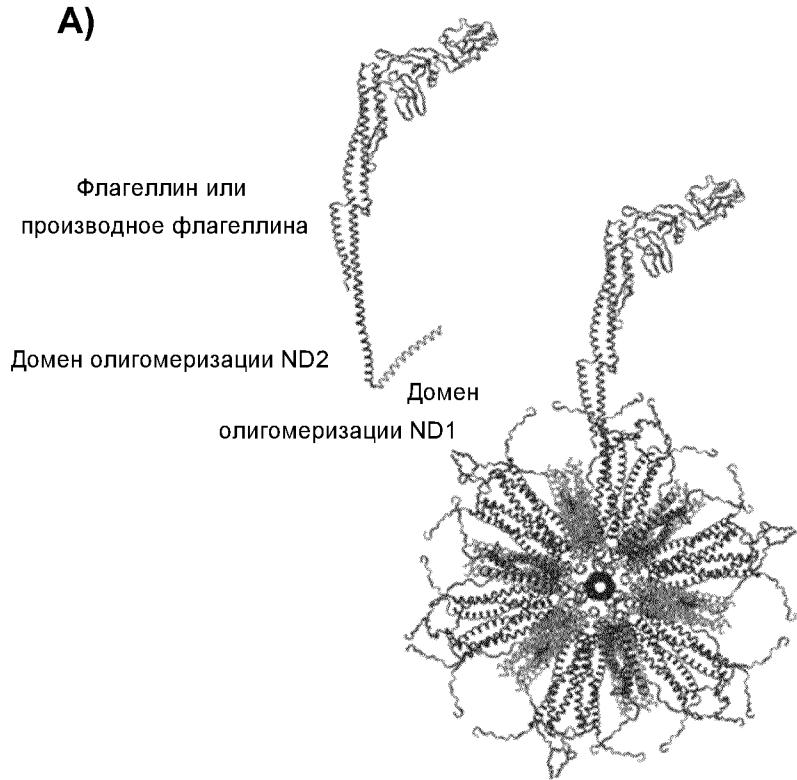
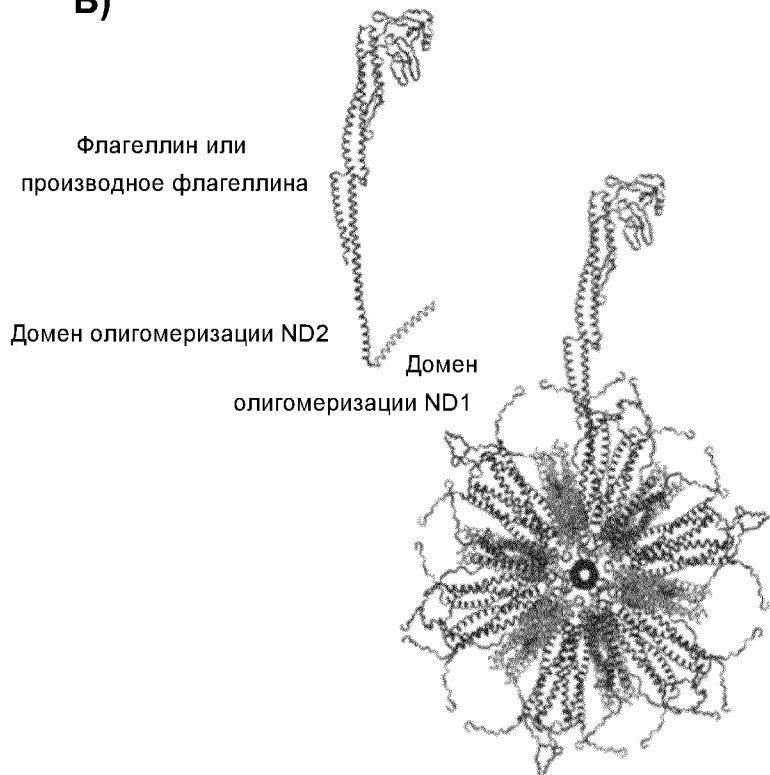
ND1 представляет собой белок, который образует олигомеры  $(ND1)_m$  из m субъединиц ND1, ND2 представляет собой белок, который образует олигомеры  $(ND2)_n$  из n субъединиц ND2, каждое m и n представляет собой число от 2 до 10 при условии, что m не равно n и не кратно n, и n не кратно m,

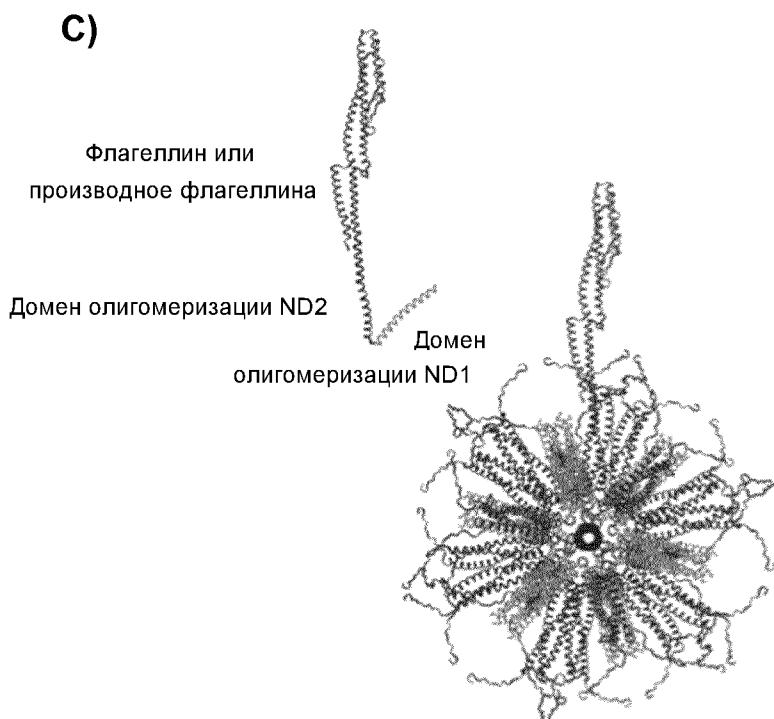
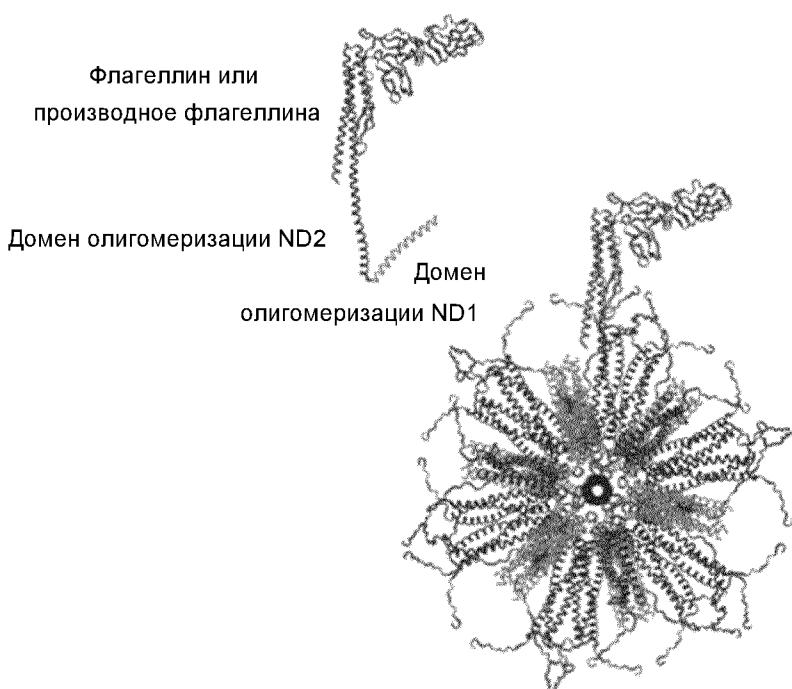
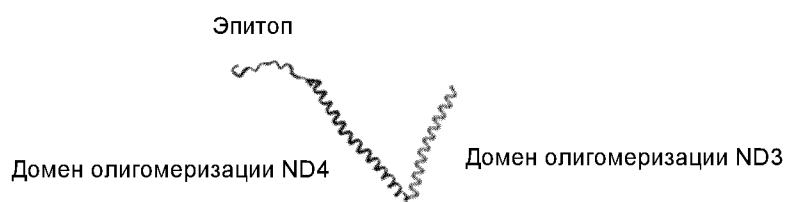
L1 представляет собой связь или короткий гибкий линкер,

FLA представляет собой флагеллин или производное флагеллина, у которого отсутствуют части последовательности аминокислот флагеллина и/или у которого от 1 до 20 аминокислот заменены другими аминокислотами, и/или дополнительно содержащее антиген, связанный непосредственно или связанный через линкер, содержащий от 1 до 20 аминокислот;

X отсутствует или представляет собой последовательность пептида или белка, содержащую от 1 до 1000 аминокислот.

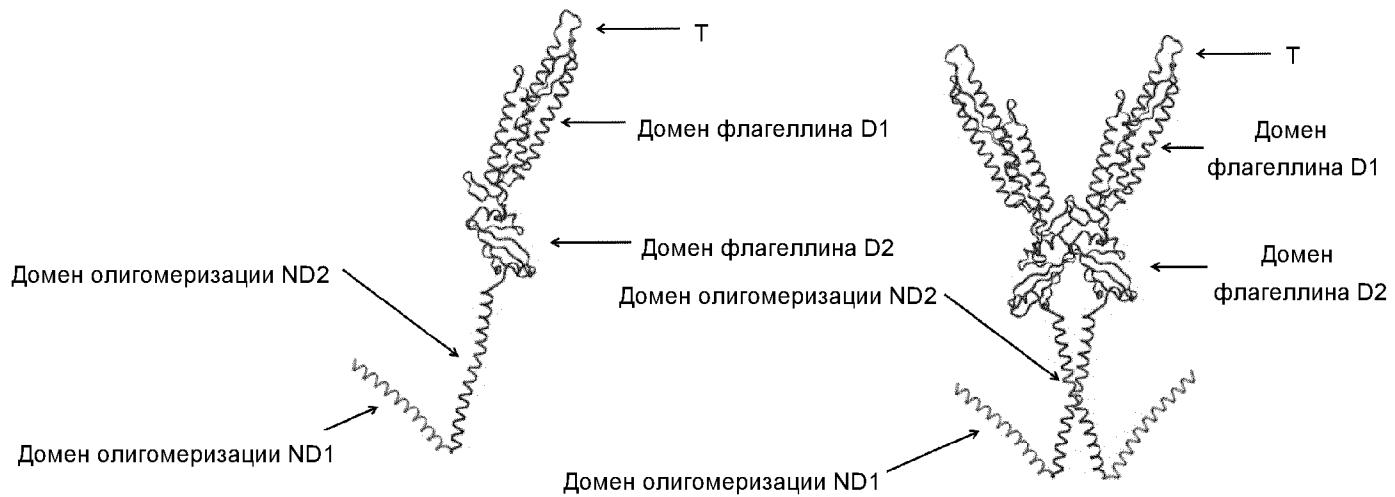
13. Способ вакцинации человека или отличного от человека животного, включающий введение эффективного количества белковой наночастицы по любому из пп. 1-10 субъекту, нуждающемуся в такой вакцинации.

**ФИГ. 1****A)****B)**

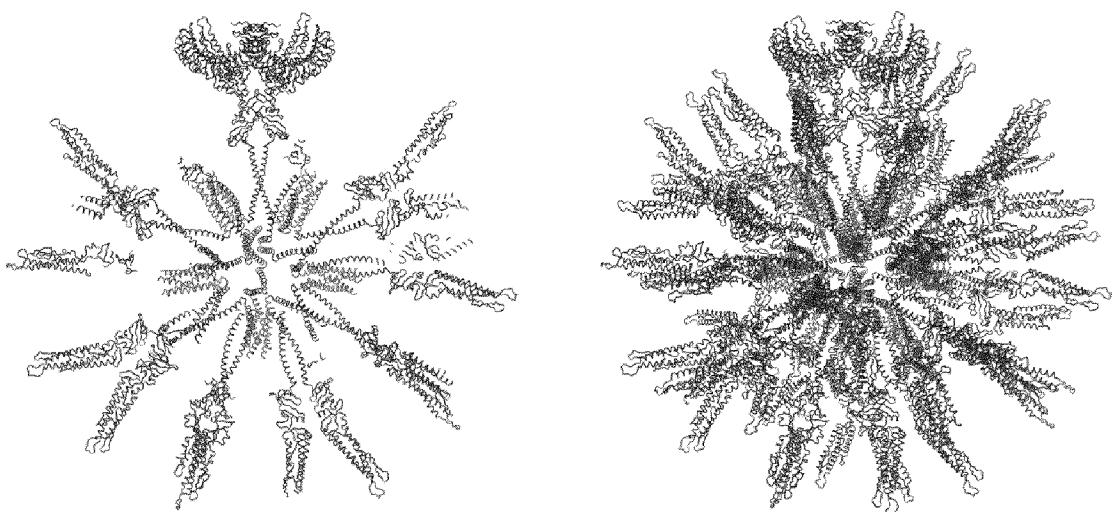
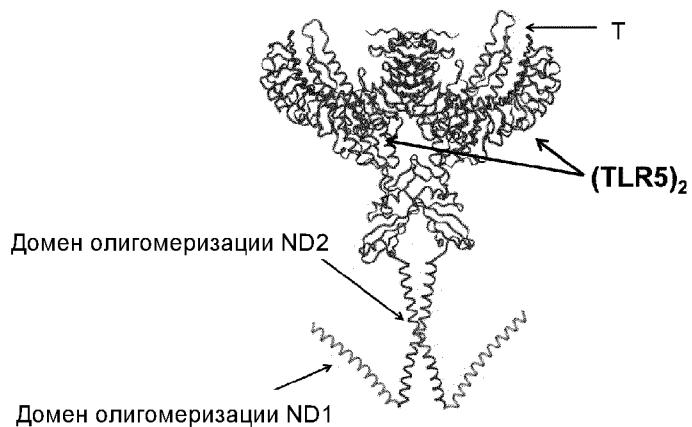
**C)****D)****E)**

Фиг. 2

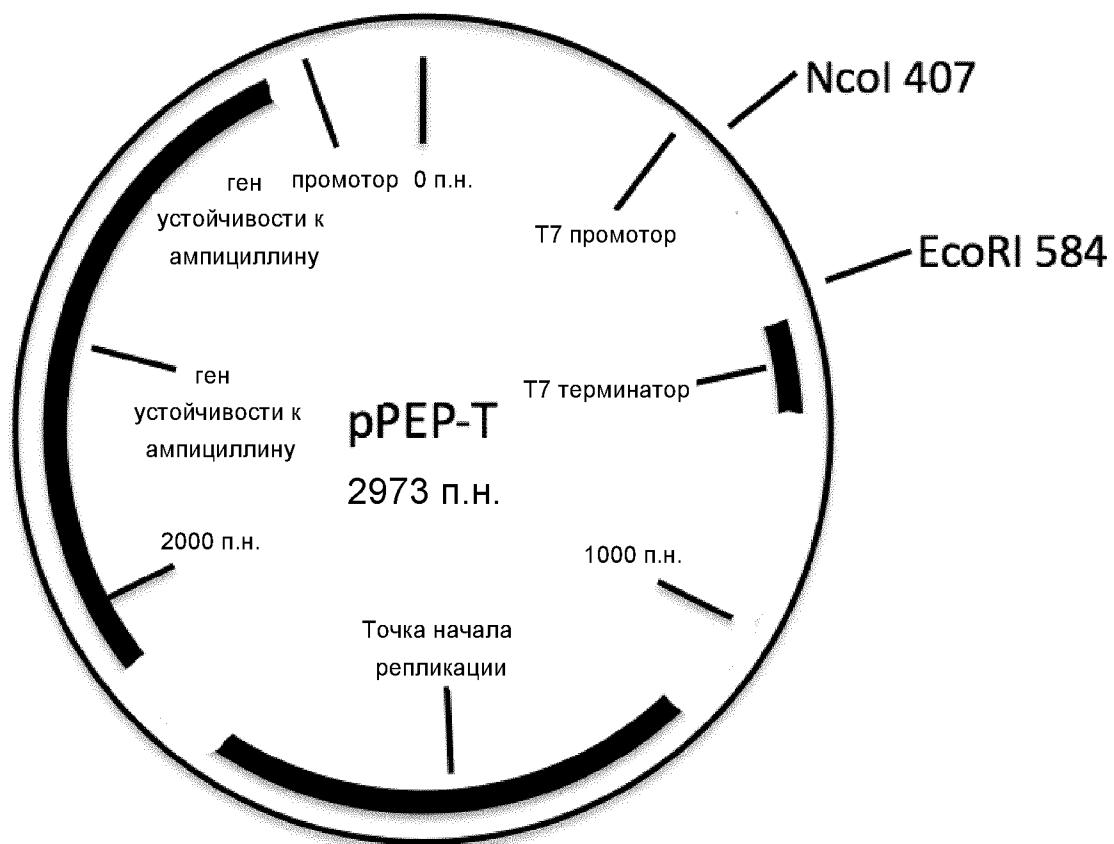
A)

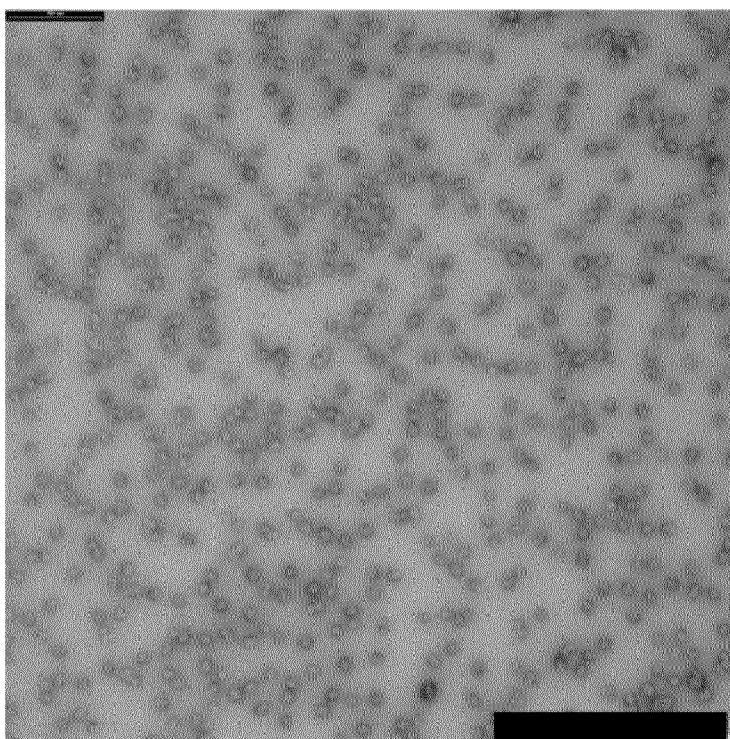
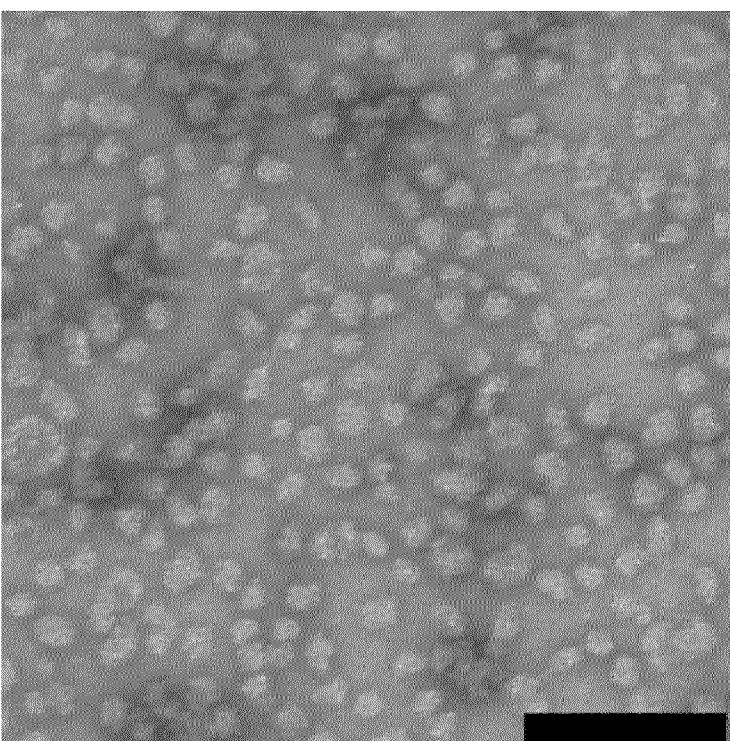


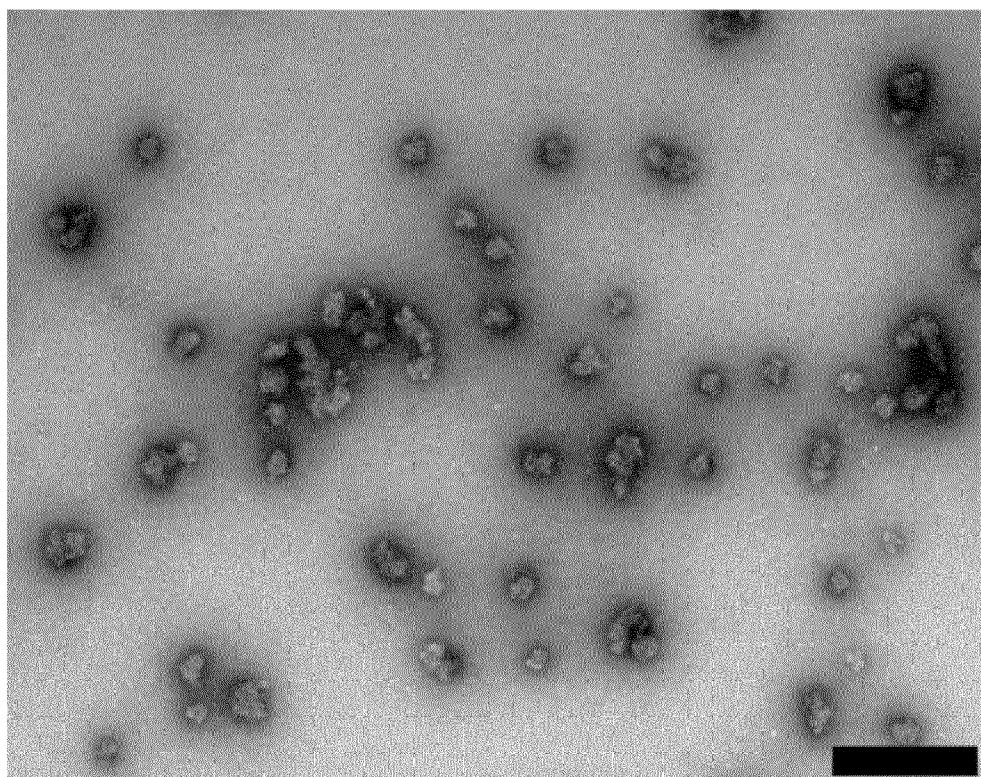
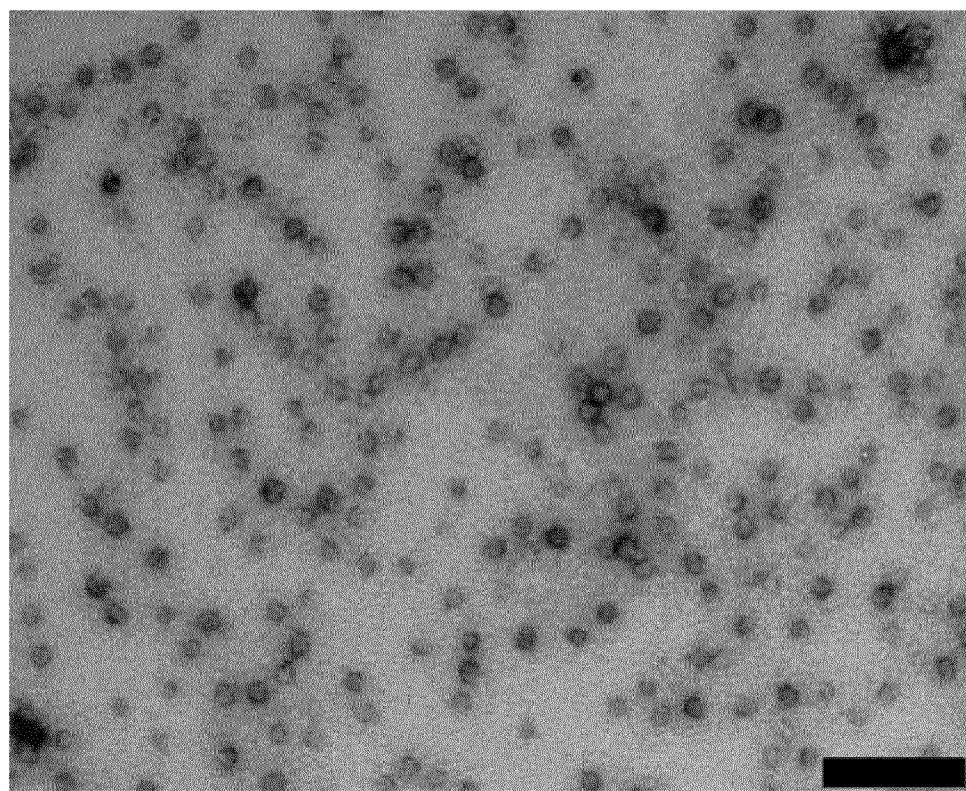
B)



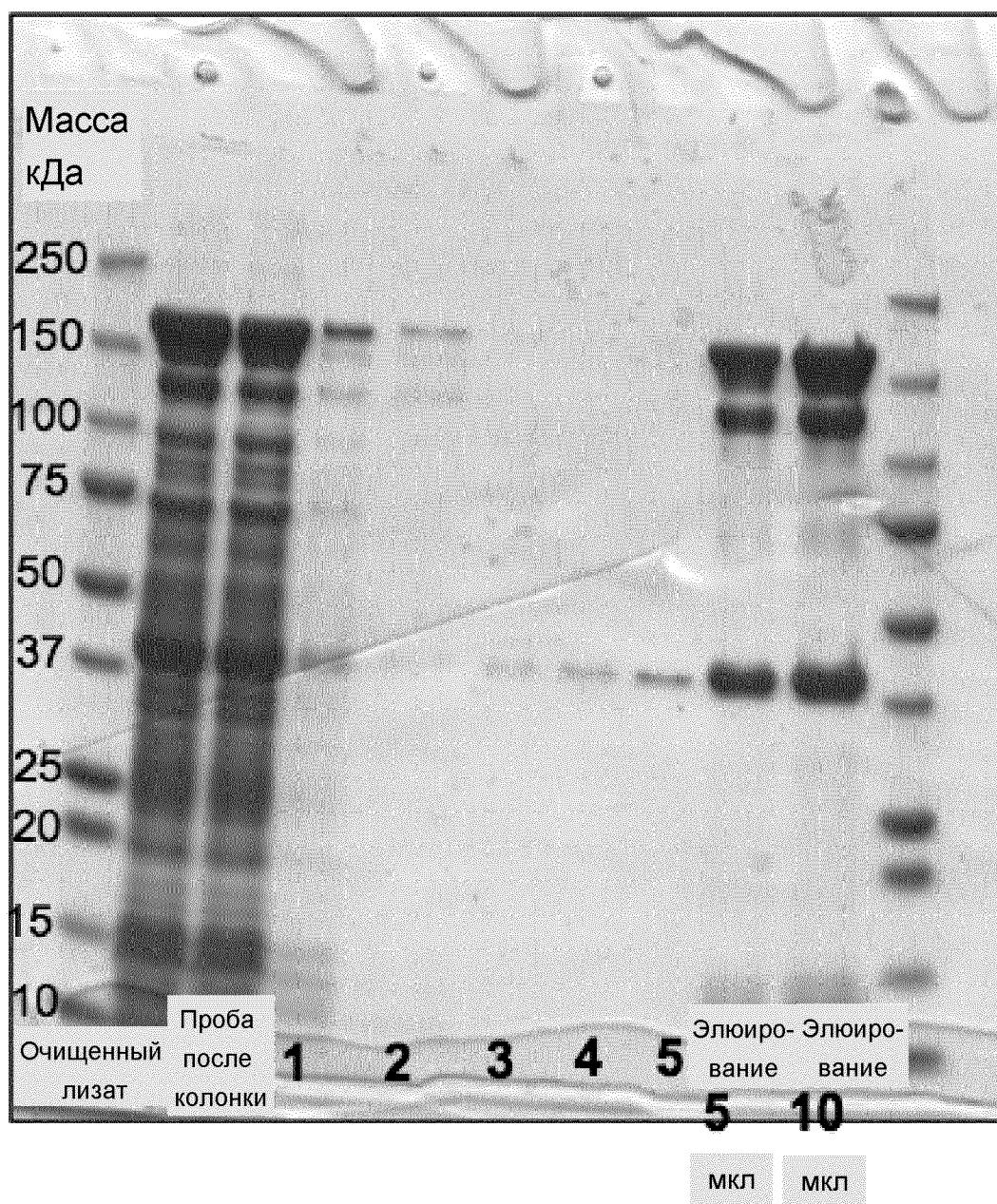
Фиг. 3



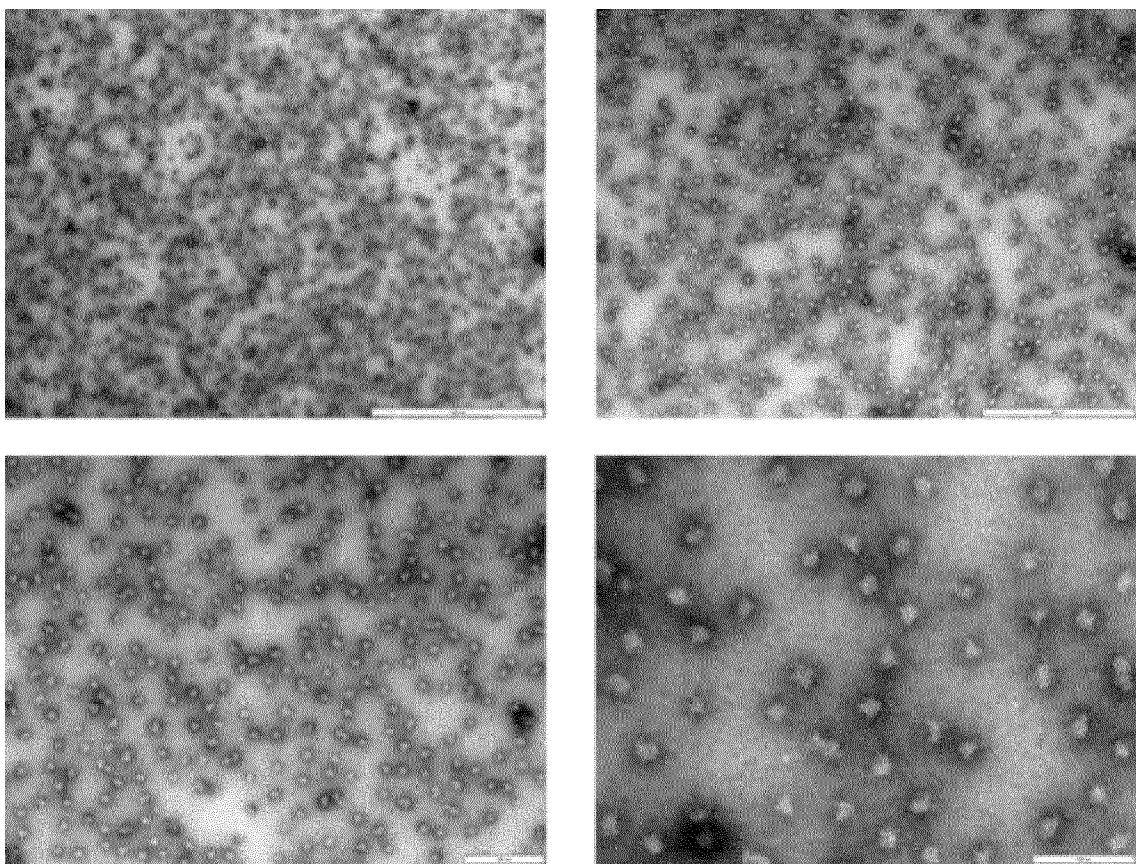
**ФИГ. 4****A****B**

**C****D**

Фиг. 5

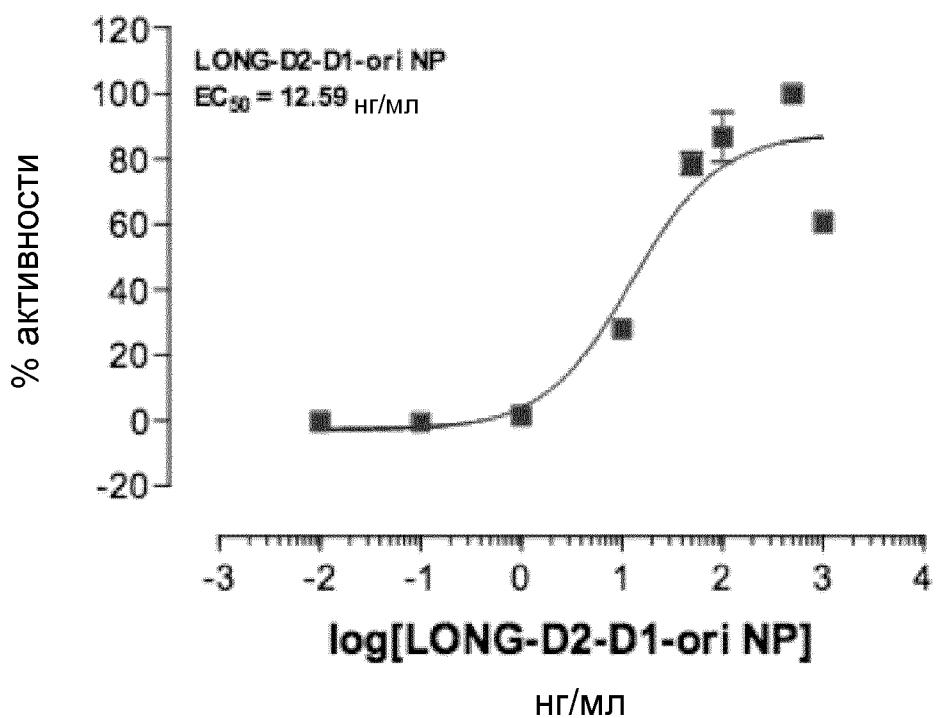
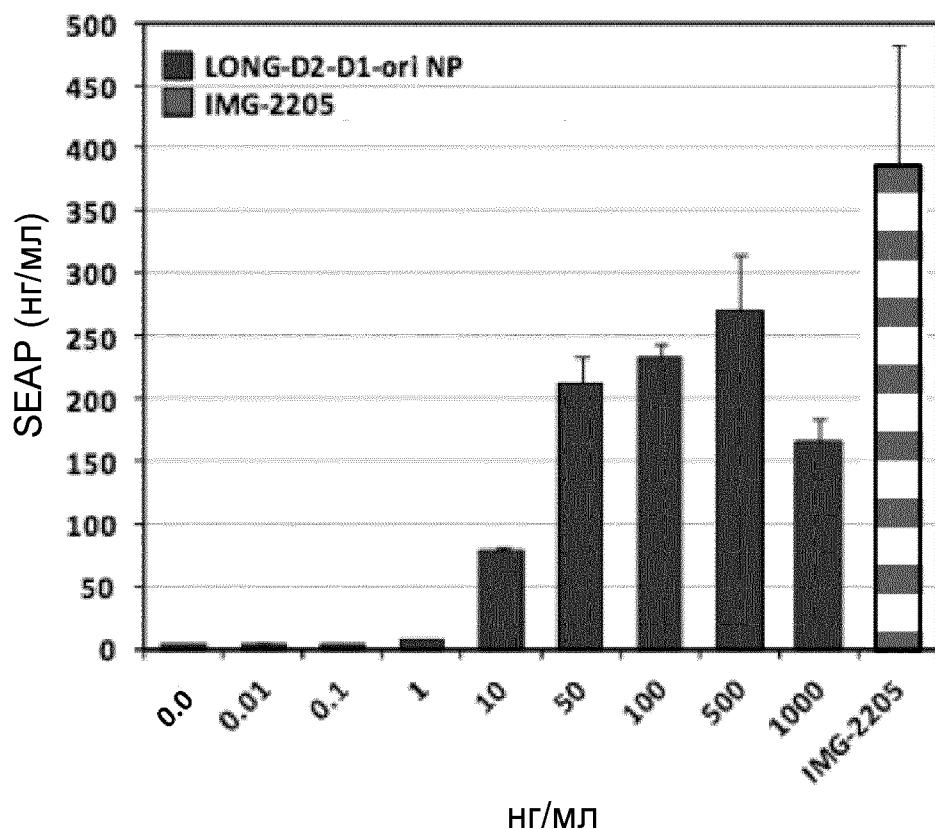


Фиг. 6

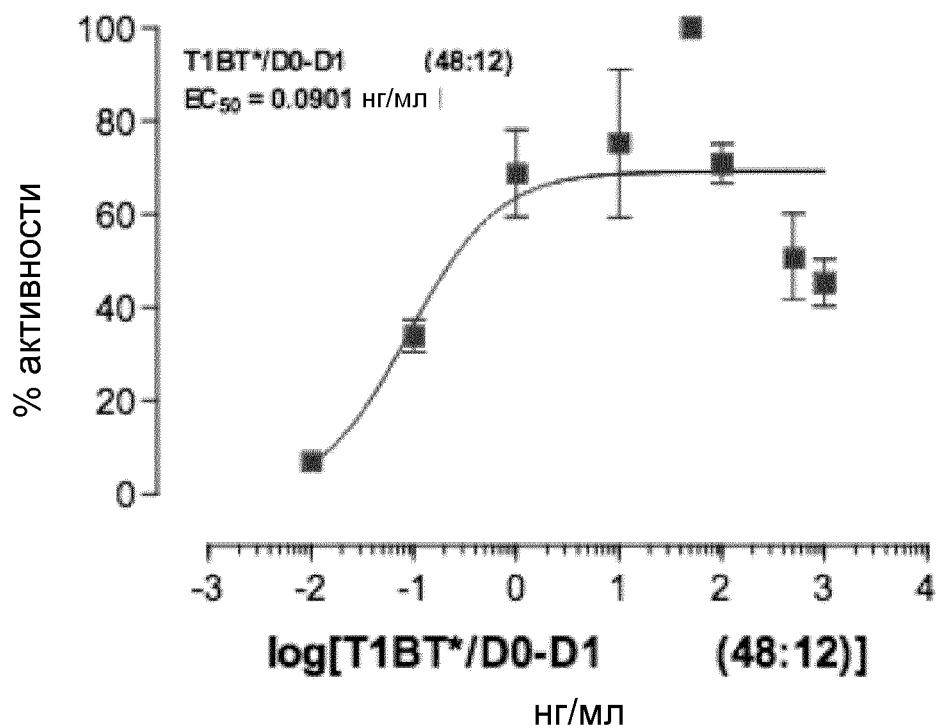
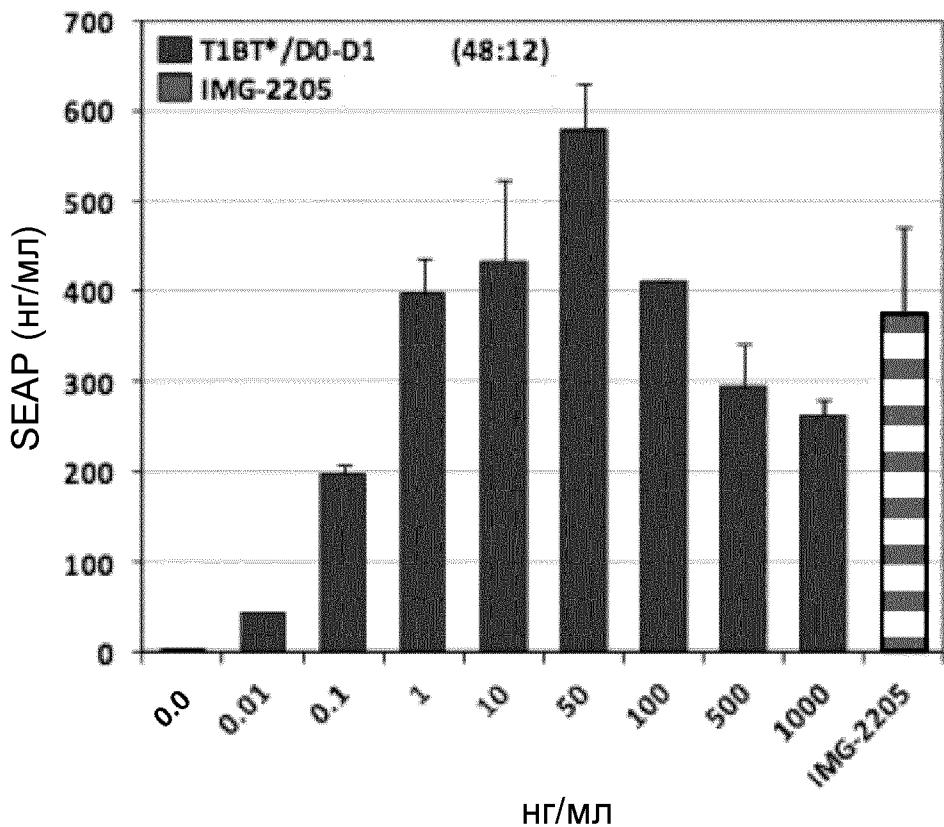


Фиг. 7

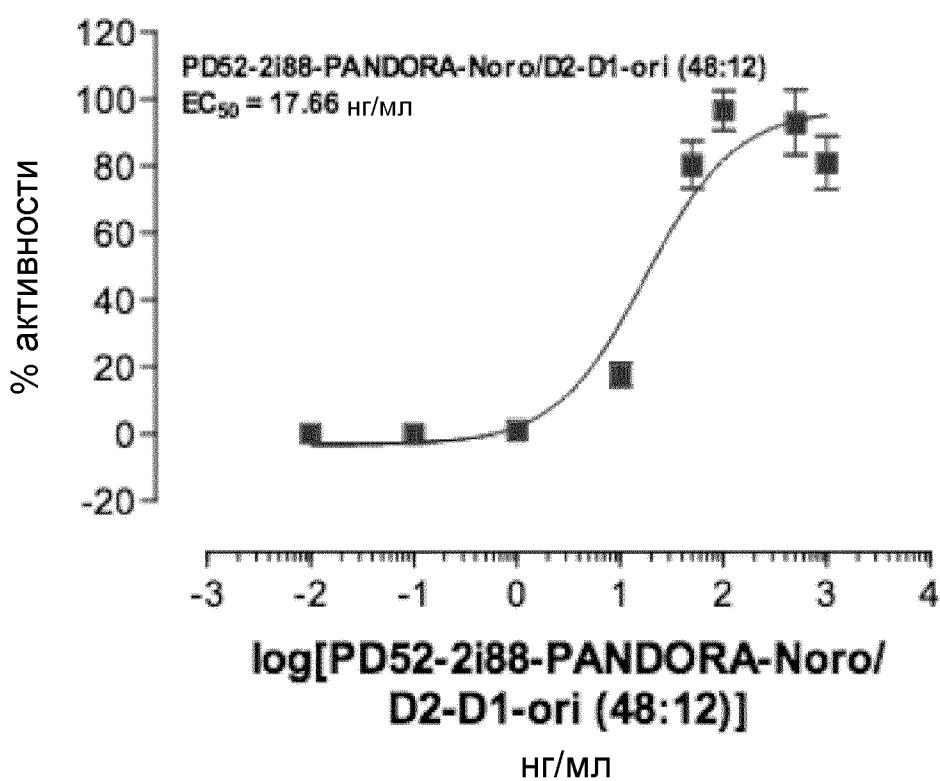
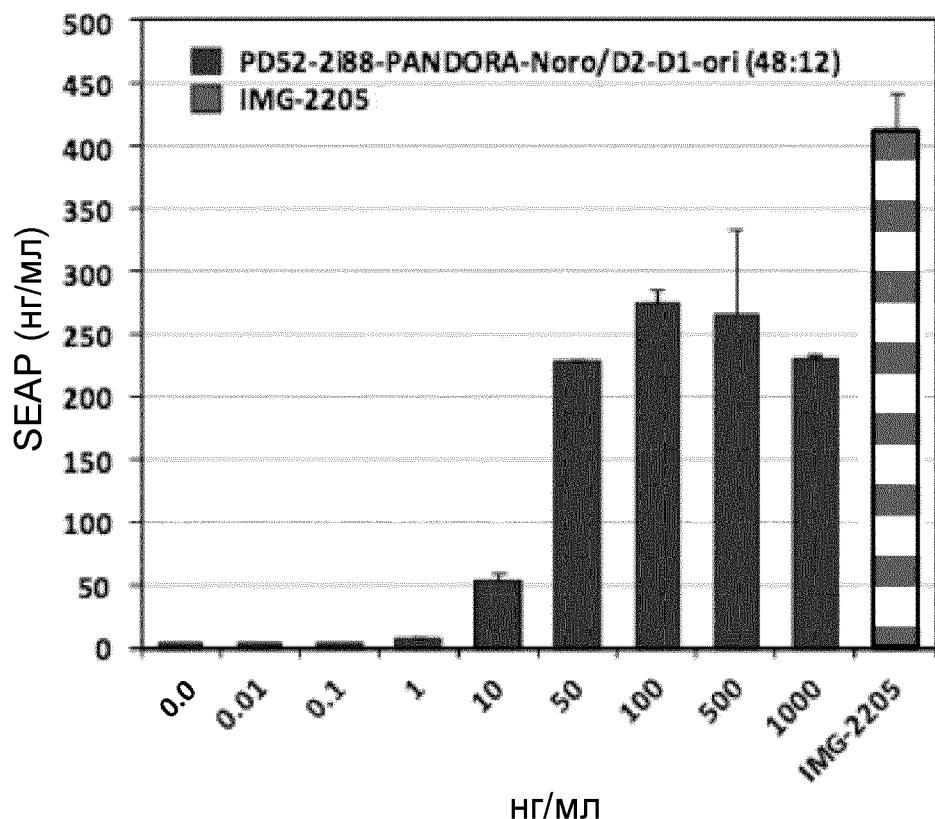
A)



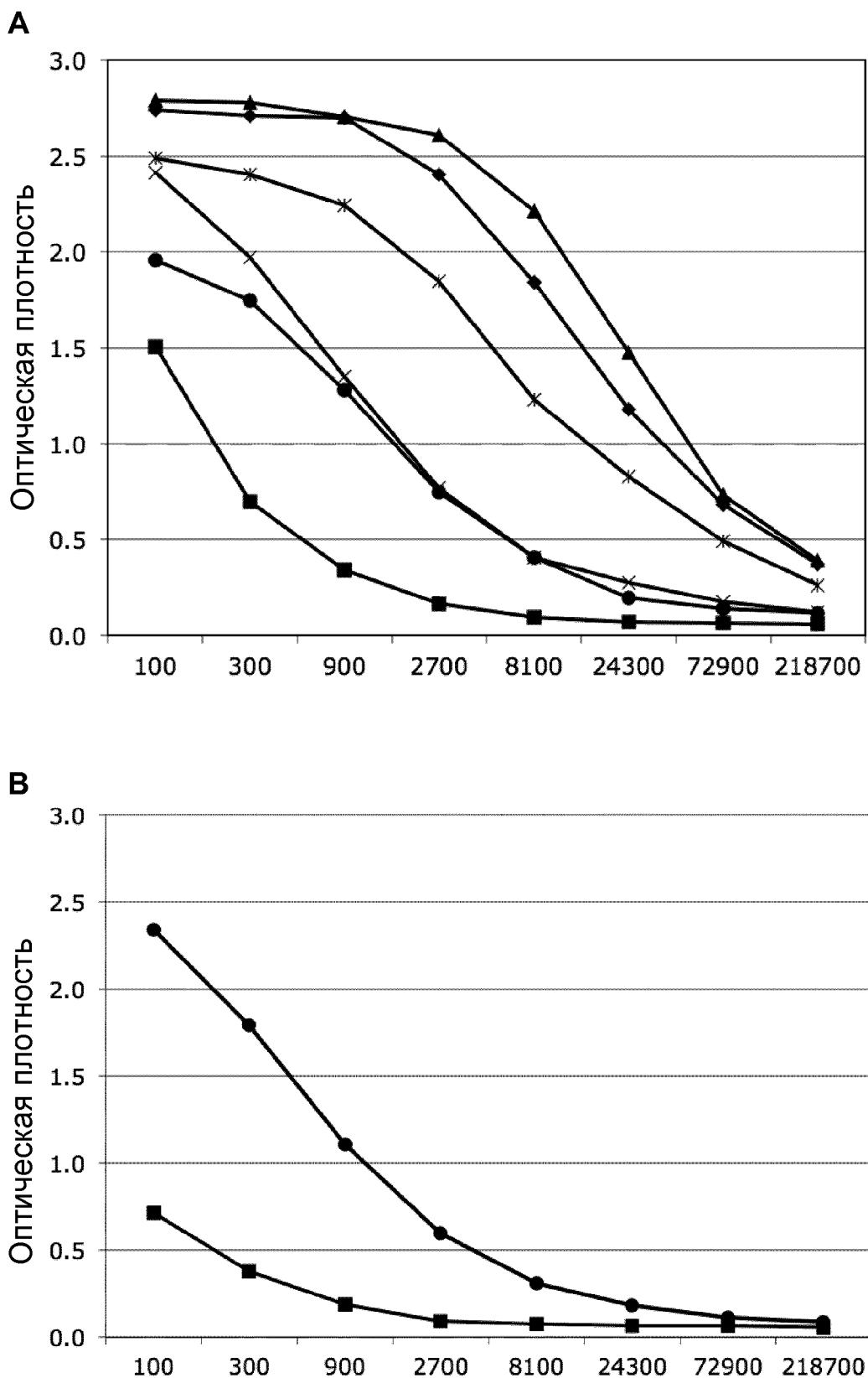
B)



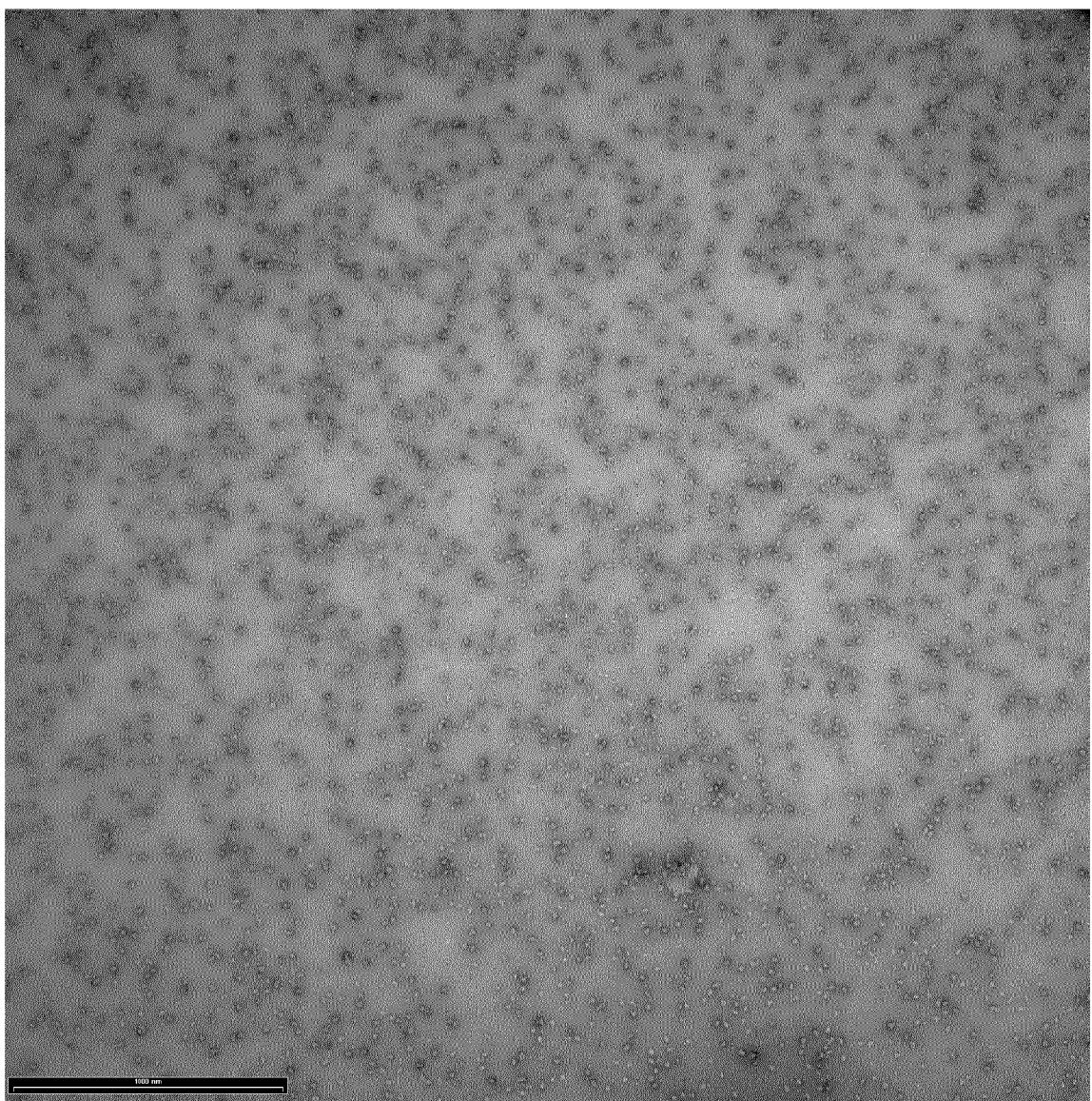
C)



Фиг. 8



Фиг. 9



Фиг. 10

