



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.06.04

(21) Номер заявки
201791598

(22) Дата подачи заявки
2016.01.15

(51) Int. Cl. **A61K 39/00** (2006.01)
A61K 39/385 (2006.01)
C07K 14/315 (2006.01)

**(54) ВИРУСОПОДОБНАЯ ЧАСТИЦА С ЭФФЕКТИВНЫМ ЭКСПОНИРОВАНИЕМ
ЭПИТОПОВ**

(31) **РА 2015 70019; РА 2015 70237**

(32) **2015.01.15; 2015.04.22**

(33) **DK**

(43) **2017.12.29**

(86) **PCT/DK2016/050011**

(87) **WO 2016/112921 2016.07.21**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ЮНИВЕРСИТИ ОФ КОПЕНГАГЕН
(DK)**

(72) Изобретатель:
**Бертелсен Адам Фредерик Сандер,
Саланти Али, Теандер Тор, Тране
Сьюзан, Янитцек Кристоф Миккель,
Орсков Агербаек Метте, Агертоуг
Нильсен Мортен (DK), Тобиас
Густафссон Ян (SE)**

(74) Представитель:
**Карпенко О.Ю., Лыу Т.Н., Угрюмов
В.М., Дементьев В.Н., Глухарёва А.О.,
Строкова О.В., Христофоров А.А.
(RU)**

(56) **WO-A2-2006037787
WO-A1-2010012069
WO-A1-2012048430
WO-A2-2014116730**

**KEDAR G. PATEL ET AL.: "Surface
Functionalization of Virus-Like Particles by
Direct Conjugation Using Azide-Alkyne Click
Chemistry", BIOCONJUGATE CHEMISTRY, ACS,
WASHINGTON, DC, US, vol. 22, no. 3, 1 March 2011
(2011-03-01), pages 376-387, XP002741347, ISSN:**

**1043-1802, DOI: 10.1021/BC100367U, [retrieved on
2011-02-28], the whole document**

**B. ZAKERI ET AL.: "Peptide tag forming
a rapid covalent bond to a protein, through
engineering a bacterial adhesin", PROCEEDINGS OF
THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, vol.
109, no. 12, 20 March 2012 (2012-03-20), pages
E690-E697, XP055217264, ISSN: 0027-8424, DOI:
10.1073/pnas.1115485109, the whole document**

**VEGGIANI GIANLUCA ET AL.: "Superglue
from bacteria: unbreakable bridges for protein
nanotechnology", TRENDS IN BIOTECHNOLOGY,
ELSEVIER PUBLICATIONS, CAMBRIDGE, GB,
vol. 32, no. 10, 26 August 2014 (2014-08-26),
pages 506-512, XP029064532, ISSN: 0167-7799,
DOI: 10.1016/J.TIBTECH.2014.08.001, the whole
document**

**FARHAT KHAN ET AL.: "Head-to-
Head Comparison of Soluble vs. Q[beta] VLP
Circumsporozoite Protein Vaccines Reveals Selective
Enhancement of NANP Repeat Responses", PLOS
ONE, vol. 10, no. 11, 16 November 2015
(2015-11-16), page e0142035, XP055258596, DOI:
10.1371/journal.pone.0142035, the whole document**

**KARL D. BRUNE ET AL.: "Plug-and-
Display: decoration of Virus-Like Particles via
isopeptide bonds for modular immunization",
SCIENTIFIC REPORTS, vol. 6, 19 January 2016
(2016-01-19), page 19234, XP055258597, DOI:
10.1038/srep19234, the whole document**

**M.F. BACHMANN ET AL.: "Therapeutic
vaccines for chronic diseases: successes and technical
challenges", VACCINE, vol. 49, no. 3, 12 October
2011 (2011-10-12), pages 303-2822, XP055162778,
ISSN: 0264-410X, DOI: 10.1002/eji.200737989, the
whole document**

(57) Изобретение относится к вакцине на основе вирусоподобных частиц (VLP). Вирусоподобная частица составляет не встречающийся в естественных условиях остов для экспонирования упорядоченного и повторяющегося массива антигена, с помощью которого можно получать сильный и длительный иммунный ответ у субъекта. Вакцину на основе VLP можно применять для профилактики и/или лечения заболевания, включающего в себя, без ограничения, злокачественную опухоль, сердечно-сосудистое заболевание, инфекционное заболевание, хроническое заболевание, неврологические заболевания/нарушения, астму и/или иммуновоспалительные заболевания/нарушения.

Область техники, к которой относится изобретение

Изобретение относится к технологии и способу получения вакцины на основе вирусоподобных частиц с эффективным экспонированием эпитопов, и которая способна к индукции сильного и длительного защитного иммунного ответа. Изобретение решает ключевую проблему получения вирусоподобной частицы, которая презентует антиген большого размера на поверхности частицы с высокой плотностью, равномерными интервалами и в соответствующей ориентации; что является тремя критически важными факторами для получения оптимальной активации иммунной системы.

Предшествующий уровень техники изобретения

Вакцины играли и продолжают играть главную роль в снижении влияния инфекционных заболеваний на здоровье в глобальном масштабе. Первое поколение вакцин имело в основе аттенуированные или инактивированные патогены. Эти вакцины на основе целого патогена оказались чрезвычайно эффективными и в некоторых случаях (например, черная оспа) привели к полному уничтожению целевого патогена. Тем не менее существуют серьезные опасения, связанные с применением целых патогенов для иммунизации, поскольку они, как было показано, индуцируют тяжелые побочные эффекты в популяциях с некоторой частотой, что подчеркивает потребность в разработке более безопасных вакцин (Plotkin S.A. et al., 2005). Совместно с недавними усовершенствованиями в технологии на основе рекомбинантной ДНК и геной инженерии в современных исследованиях вакцин были приложены усилия для идентификации критически важных антигенных мишеней нейтрализующих антител с целью разработки так называемых "субъединичных вакцин", состоящих исключительно из четко определенных очищенных компонентов антигенов (Murray K. et al., 1988). Иммуногенность субъединичных вакцин на основе растворимых белков с низкой валентностью является, к сожалению, низкой по сравнению с иммуногенностью у вакцин на основе целых патогенов. Таким образом, для индукции гуморального иммунного ответа с получением высокого титра антител часто необходимо применение высоких доз антигена, введение бустер-доз и совместное введение адъювантов, и даже в таком случае эти субъединичные вакцины обычно не являются способными к индукции длительного защитного иммунитета. Это действительно подтверждается примерами недостаточной эффективности многих вакцин с растворимыми белками с низкой валентностью, наблюдаемыми в течение последних нескольких лет, и привело к предположению, что размер, валентность и пространственная структура антигенного компонента вакцины являются критически важными параметрами для оптимальной активации иммунной системы.

Вирусоподобные частицы (VLP), которые являются как высокоиммуногенными, так и безопасными, представляют собой основное усовершенствование в разработке субъединичных вакцин, объединяющее многие из преимуществ вакцин на основе целых патогенов и простых рекомбинантных субъединичных вакцин. VLP состоят из одного или нескольких рекомбинантно экспрессируемых вирусных белков, которые спонтанно собираются в макромолекулярные структуры по типу частиц, имитирующие морфологию нативной вирусной оболочки, но лишённые инфекционного генетического материала. Основные свойства частиц и размер VLP (22-150 нм) представляются оптимальными для эффективного поглощения профессиональными антигенпрезентирующими клетками, в особенности дендритными клетками (DC), а также для попадания в лимфатические сосуды, и, следовательно, VLP эффективно стимулируют как гуморальное, так и клеточное звено иммунной системы (Bachmann M.F., Jennings G.T., 2010). Более того, поверхностные структуры, презентующие антиген с высокой плотностью, равномерными интервалами и в соответствующей ориентации, являются характерными для микробных поверхностных антигенов, в отношении которых в иммунной системе млекопитающего развивается сильная реакция. На молекулярном уровне презентирование эпитопа с высокой плотностью при одновременном сохранении равномерных интервалов и в соответствующей ориентации обеспечивает возможность эффективного перекрестного связывания В-клеточных рецепторов (Bachmann M.F. and Zinkemagel R.M. 1997), приводящего к сильным В-клеточным реакциям даже в отсутствие помощи Т-клеток (Bachmann M.F. et al., 1993; Chackerian et al., 1999; Kouskoff V. et al., 2000), и совокупные данные от нескольких исследований указывают на то, что В-клетки, по сути, различают антигенные паттерны по степени перекрестного связывания с поверхностным Ig и посредством использования повторяемости антигена в качестве признака для распознавания "свой/чужой".

В течение длительного периода привлекательной целью являлось использование VLP в качестве платформы для усиления иммуногенности для индукции иммунных реакций в отношении гетерологичных антигенов посредством применения VLP в качестве молекулярных остовов для презентирования антигенов. Антитела считаются первичными эффекторами для всех современных профилактических микробных вакцин, и, следовательно, основной целью для разработки вакцин на основе VLP является индукция сильных гуморальных реакций, что является особенно верным при целенаправленном воздействии на аутоантигены. Традиционно это достигалось либо посредством встраивания антигенных эпитопов в VLP с помощью генетического слияния (химерные VLP), либо посредством конъюгирования антигенов с предварительно собранными VLP. Подход с созданием химерных VLP в настоящее время является наиболее широко распространенным способом для экспонирования гетерологичных эпитопов на VLP (Pumpens P. and Grens E., 2001; Bachmann M.F. and Jennings G.T., 2004a; Chackerian, 2007; Grgacic E.V.L. and Anderson D.A., 2006). Тем не менее, эта стратегия жестко ограничивается как размером, так и приро-

дой эпитопов, которые могут быть введены в VLP, особенно в их области антигенной детерминанты, и, в целом, не представлялось возможным введение пептидов длиннее чем 20 аминокислот без нарушения тонкого процесса самосборки VLP. Кроме того, этот подход требует, чтобы критически важные эпитопы уже были идентифицированы в целевом антигене, и чтобы они могли презентироваться в области антигенной детерминанты на поверхности VLP при сохранении их нативной конформации. Таким образом, несмотря на растущее понимание структуры VLP/процесса сборки VLP, создание химерных VLP все еще осуществляется методом проб и ошибок, и все еще не представляется возможным спрогнозировать, будут ли отдельные пептиды совместимыми со сборкой VLP, или будут ли введенные эпитопы иммуногенными. Наконец, вследствие малого размера вводимых полипептидных последовательностей антитела, образующиеся при индукции гуморального иммунного ответа, будут, по сути, моноклональными в плане функции, что в некоторых случаях будет накладывать ограничение на эффективность защиты.

С другой стороны, химическое конъюгирование, например, посредством химического биотинилирования обращенных к поверхности лизиновых остатков, обеспечивает возможность прикрепления разнообразных видов целевых антигенов (в том числе небелковых мишеней) к VLP, и этот подход, в принципе, не ограничивается размером антигена (Raja K.S. et al., 2003). Тем не менее, до сих пор лишь относительно короткие пептиды успешно связывали с поверхностью VLP с высокой плотностью и в соответствующей ориентации (Bachmann M.F., Jennings G.T., 2011), а в случае антигенов большего размера остается значительная сложность контроля как ориентации, так и общего количества/стехиометрического состава связанного антигена, что оказывает влияние как на плотность, так и на равномерность размещения экспонируемых эпитопов, и, следовательно, потенциально ограничивает иммунный ответ. Помимо этого, процедуры химического связывания редко являются совместимыми с получением вакцины в крупном масштабе. Как результат, современные технологии не являются достаточными для обеспечения экспонирования антигенов на VLP с высокой плотностью, равномерным интервалом и в соответствующей ориентации, причем данные признаки представляют собой три критически важных фактора для получения сильной и длительной активации иммунной системы.

Вкратце:

индукцию сильного и длительного иммунного ответа на патогены, а также антигены, ассоциированные с заболеваниями, очень сложно получить с использованием простых субъединичных вакцин;

доказано, что презентирование антигенов на вирусоподобных частицах (VLP) является очень эффективным при индукции очень функциональных длительных иммунных реакций;

связывание антигена на поверхности VLP с высокой плотностью и в соответствующей ориентации для оптимального экспонирования эпитопов представляет собой основную биотехнологическую задачу.

Краткое раскрытие изобретения

Изобретением решаются задачи получения VLP, которые презентуют поверхностные антигены плотно и с равномерными интервалами в соответствующей ориентации. Такие VLP являются способными к эффективному экспонированию эпитопов и, следовательно, способны к индукции длительного защитного иммунитета у субъекта. Общая идея настоящего изобретения проиллюстрирована на фиг. 1. Авторами изобретения были идентифицированы бактериофаги (например, AP205), в которых Spytag и/или SpyCatcher могут быть слиты с белком капсида без риска нарушения самосборки частицы.

Неожиданно авторы изобретения оказались способны обеспечить слияние полной 116 аминокислотной SpyCatcher с N-концом белка капсида AP205. Кроме того, авторам изобретения удалось создать систему для получения антигенов, слитых с полипептидом SpyCatcher и/или SpyTag, которая обеспечивает контроль ориентации связанного антигена. Специфичное взаимодействие между SpyTag и SpyCatcher (Zakeri B. et al., PNAS, 2012) обеспечивает контроль общего количества/стехиометрического состава, а также экспонирование антигенов в плотном и повторяющемся порядке в соответствующей ориентации, что является важным для получения на выходе эффективного экспонирования эпитопов и, как следствие, сильного иммунного ответа. Неожиданно, авторы настоящего изобретения обнаружили, что большой белок SpyCatcher, который содержит более 100 аминокислот, может быть слит с белком капсида без нарушения процесса спонтанной самосборки VLP. Описанный осто для экспонирования антигенов является уникальным, поскольку он впервые обеспечивает связывание практически любого антигена на поверхности VLP с высокой плотностью, таким образом презентуя упорядоченные массивы конкретных антигенов, все из которых поддерживаются в одинаковой ориентации, таким образом решая три ключевых проблемы обеспечения эффективного иммунного ответа. Систему можно применять как для целенаправленного воздействия на аутоантигены (т.е. нарушения толерантности), так и для эффективного целенаправленного воздействия на инфекционные организмы.

SpyTag и SpyCatcher взаимодействуют посредством спонтанного образования изопептидной связи (Zakeri B. et al., PNAS, 2012). Оно представляет собой ковалентное взаимодействие и обеспечивает высокую прочность, взаимодействие в формате один к одному между SpyTag и связанным со SpyCatcher антигеном. Гибкость изопептидной связи ограничивается конформацией полипептида из соединенных вместе SpyTag-SpyCatcher, обеспечивая соответствующую ориентацию антигенов, экспонируемых таким образом на VLP.

Описанные выше проблемы решаются с помощью аспектов и вариантов осуществления настоящего

изобретения, характеризующихся в пунктах формулы изобретения. Как проиллюстрировано на фиг. 1, основной аспект настоящего изобретения относится к вакцине для применения в профилактике и/или лечении заболевания, причем вакцина содержит:

- i) белок капсида вируса, содержащий первую пептидную метку, и
- ii) антиген, слитый со второй пептидной меткой,

причем антиген и белок капсида вируса связаны посредством изопептидной связи между первой и второй пептидной меткой, и при этом i-ii образуют вирусоподобную частицу, экспонирующую указанный антиген.

В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления белок капсида вируса содержит белок капсида AP205 и/или белок капсида фага fr, слитые со SpyCatcher, причем слитый белок из белка капсида и SpyCatcher способен к образованию вирусоподобной частицы. В соответствии с дополнительным вариантом осуществления SpyCatcher является слитой с N-концом белка капсида AP205, необязательно, через линкер.

Другой основной аспект настоящего изобретения относится к вакцине для применения в профилактике и/или лечении заболевания, причем вакцина содержит:

- i) белок капсида AP205 и/или белок капсида фага fr, содержащие вставку полипептида SpyCatcher, и
- ii) антиген, слитый со SpyTag,

причем антиген и белок капсида AP205 и/или белок капсида fr связаны посредством взаимодействия между Spytag и SpyCatcher, и при этом i-ii образуют вирусоподобную частицу, экспонирующую указанный антиген.

В соответствии с одним вариантом осуществления вакцина для применения в профилактике и/или лечении заболевания содержит:

- i) белок капсида AP205 и/или белок капсида фага fr, содержащие вставку полипептида SpyTag, и
- ii) антиген, слитый со SpyCatcher,

причем антиген и белок капсида AP205 и/или белок капсида fr связаны посредством взаимодействия между Spytag и SpyCatcher, и при этом i-ii образуют вирусоподобную частицу, экспонирующую указанный антиген.

Описанные выше проблемы решаются с помощью аспектов и вариантов осуществления настоящего изобретения, характеризующихся в пунктах формулы изобретения. Как проиллюстрировано на фиг. 1, основной аспект настоящего изобретения относится к вакцине для применения в профилактике и/или лечении заболевания, причем вакцина содержит:

i) белок капсида AP205 и/или белок капсида фага fr, содержащие вставку полипептида SpyCatcher, в результате чего белок капсида может самособираться в VLP, которая экспонирует SpyCatcher в контексте, в котором она связывается со SpyTag, и

ii) антиген, слитый со SpyTag, причем антиген и белок капсида AP205 и/или белок капсида фага fr связаны посредством взаимодействия между Spytag и SpyCatcher, и при этом i-ii образуют вирусоподобную частицу, экспонирующую указанный антиген.

В соответствии с одним вариантом осуществления вакцина для применения в профилактике и/или лечении заболевания содержит:

i) белок капсида AP205 и/или белок капсида фага fr, содержащие вставку полипептида SpyTag, в результате чего белок капсида может самособираться в VLP, которая экспонирует SpyTag в контексте, в котором она связывается со SpyCatcher, и

ii) антиген, слитый со SpyCatcher, причем антиген и белок капсида AP205 и/или белок капсида фага fr связаны посредством взаимодействия между Spytag и SpyCatcher, и при этом i-ii образуют вирусоподобную частицу, экспонирующую указанный антиген.

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к вектору, содержащему по меньшей мере один полинуклеотид, кодирующий:

- i) белок капсида AP205 и/или белок капсида фага fr, содержащие вставку полипептида SpyCatcher, и
- ii) антиген, слитый со SpyTag,

причем антиген и белок капсида AP205 и/или белок капсида фага fr связаны посредством взаимодействия между Spytag и SpyCatcher, и при этом i-ii образуют вирусоподобную частицу, экспонирующую указанный антиген.

В соответствии с одним вариантом осуществления вектор содержит по меньшей мере один полинуклеотид, кодирующий:

- i) белок капсида AP205 и/или белок капсида фага fr, содержащие вставку полипептида SpyTag, и
- ii) антиген, слитый со SpyCatcher,

причем антиген и белок капсида AP205 и/или белок капсида фага fr связаны посредством взаимодействия между Spytag и SpyCatcher, и при этом i-ii образуют вирусоподобную частицу, экспонирующую указанный антиген.

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к клетке-хозяину, экспрессирующей по меньшей мере один полипептид, кодируемый указанным полинуклеотидом.

В еще одном аспекте изобретение относится к композиции, содержащей указанную вакцину.

Дополнительный аспект настоящего изобретения относится к способу получения фармацевтической композиции, содержащей указанную вакцину, причем способ предусматривает стадии:

- i) получения первого полипептида; белка капсида AP205 и/или белка капсида фага fr, содержащих SpyCatcher, и
- ii) получения второго полипептида; антигена, слитого со SpyTag, и
- iii) воздействия на первый полипептид условиями, которые обеспечивают возможность образования вирусоподобных частиц, и
- iv) получения вакцины с помощью связывания второго полипептида и указанных вирусоподобных частиц посредством взаимодействия между SpyTag и SpyCatcher в указанных вирусоподобных частицах, и
- v) образования композиции, содержащей указанную вакцину, получая таким образом фармацевтическую композицию.

В соответствии с одним вариантом осуществления способ получения фармацевтической композиции, содержащей указанную вакцину, предусматривает стадии:

- i) получения первого полипептида; белка капсида AP205 и/или белка капсида фага fr, содержащих SpyTag, и
- ii) получения второго полипептида; антигена, слитого со SpyCatcher, и
- iii) воздействия на первый полипептид условиями, которые обеспечивают возможность образования вирусоподобных частиц, и
- iv) получения вакцины с помощью связывания второго полипептида и указанных вирусоподобных частиц посредством взаимодействия между SpyTag и SpyCatcher в указанных вирусоподобных частицах, и
- v) образования композиции, содержащей указанную вакцину, получая таким образом фармацевтическую композицию.

Кроме того, аспект настоящего изобретения относится к способу введения указанной вакцины для лечения и/или предупреждения клинического состояния у субъекта, нуждающегося в этом, предусматривающему стадии:

- i) получения композиции, содержащей по меньшей мере одну вакцину, и/или
- ii) введения субъекту указанной композиции, по меньшей мере, однократно для профилактики и/или лечения заболевания.

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к набору, содержащем:

- i) композицию, содержащую вакцину, и
- ii) медицинский инструмент или другие средства для введения вакцины, и
- iii) инструкции к применению набора.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к способу индукции иммунного ответа у субъекта, причем способ предусматривает стадии:

- i) получения композиции, содержащей по меньшей мере одну вакцину, и
- ii) введения субъекту указанной композиции по меньшей мере однократно для профилактики и/или лечения заболевания.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1 - общий вид изобретения. Стадии получения при создании полностью биотинилированного слитого белка SpyTag-белок капсида, связанного со слитым белком SpyCatcher-антиген. SpyC представляет собой сокращение от SpyCatcher;

фиг. 2 - общий вид настоящего изобретения. Стадии получения при создании слитого белка SpyTag/KTag-белок капсида, связанного со слитым белком SpyTag/KTag-антиген;

фиг. 3 - трансмиссионная электронная микроскопия вирусоподобных частиц на основе SpyTag-AP205. На TEM-изображении показаны неагрегированные VLP размером примерно 30 нм, собранные из слитого белка Spy-AP205 (SEQ ID NO: 62);

фиг. 4 - эффективность связывания SpyTag-VLP/SpyCatcher-антиген. На фигуре (гели от SDS-PAGE (электрофорез в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия)) показана собранная фракция после ультрацентрифугирования в градиенте плотности смеси VLP на основе SpyTag-AP205 (SEQ ID NO: 62) и двух разных слитых белков spycatcher-антиген (SEQ ID NO: 19 (фиг. 4A) и 21 (фиг. 4B) соответственно). Молярное соотношение между конъюгируемыми слитым белком spy-белок капсида AP205 и слитым белком spycatcher-антиген по сравнению с количеством неконъюгированного слитого белка spy-белок капсида AP205 можно применять для оценки эффективности связывания антиген-VLP. В случае данного эксперимента оценивается, что 80-100% слитого белка spy-белок капсида AP205 конъюгируются со слитым белком spycatcher-антиген;

фиг. 5 - трансмиссионная электронная микроскопия вирусоподобных частиц на основе SpyTag-AP205, связанных со слитым белком SpyCatcher-IL-5(C63T/C105T) (SEQ ID NO: 19). На TEM-изображении показаны неагрегированные VLP, собранные из spy-AP205 (SEQ ID NO: 62). Выявленный средний размер связанных с антигеном VLP кажется на ~25-35 нм больше по сравнению с соответствующими несвязанными VLP на основе spy-AP205;

фиг. 6 - трансмиссионная электронная микроскопия вирусоподобных частиц на основе SpyCatcher-

AP205. На ТЕМ-изображении показаны неагрегированные VLP размером примерно 30 нм, собранные из SpyCatcher-AP205 (SEQ ID NO: 76);

фиг. 7 - эффективность связывания SpyCatcher-VLP/SpyTag-антиген. На фигуре (гели от SDS-PAGE) показана собранная фракция после ультрацентрифугирования в градиенте плотности смеси VLP на основе SpyCatcher-AP205 (SEQ ID NO: 76) и слитого белка SpyTag-антиген (SEQ ID NO: 82). Молярное соотношение между конъюгируемыми слитым белком SpyCatcher-белок капсида AP205 и слитым белком SpyTag-антиген по сравнению с количеством неконъюгированного слитого белка SpyCatcher-белок капсида AP205 можно применять для оценки эффективности связывания антиген-VLP. В случае данного эксперимента оценивается, что 80-100% слитого белка SpyCatcher-белок капсида AP205 конъюгируются со слитым белком SpyTag-антиген;

фиг. 8 - трансмиссионная электронная микроскопия вирусоподобных частиц на основе SpyCatcher-AP205, связанных со SpyTag-ID1ID2a (SEQ ID NO: 82). На ТЕМ-изображении показаны неагрегированные VLP, собранные из SpyCatcher-AP205 (SEQ ID NO: 76). Выявленный средний размер связанных с антигеном VLP кажется на ~35 нм больше по сравнению с соответствующими несвязанными VLP на основе SpyCatcher-AP205;

фиг. 9 - динамическое рассеяние света вирусоподобными частицами на основе SpyTag-AP205 отдельно или связанными со слитым белком SpyCatcher-антиген. На графике показаны VLP, собранные из SpyTag-AP205 (SEQ ID NO: 62). Частицы на основе SpyTag-AP205 являются монодисперсными и имеют размер 34 нм. Вирусоподобные частицы на основе SpyTag-AP205, связанные со слитым белком SpyCatcher-антиген (SEQ ID NO: 19), также являются монодисперсными и имеют размер 73 нм, что на 39 нм больше по сравнению с соответствующими несвязанными VLP на основе SpyTag-AP205;

фиг. 10 - динамическое рассеяние света вирусоподобными частицами на основе SpyCatcher-AP205 отдельно или связанными со слитым белком SpyTag-антиген. На графике показаны VLP, собранные из SpyCatcher-AP205 (SEQ ID NO: 76). Частицы на основе SpyCatcher-AP205 являются монодисперсными и имеют размер 42 нм. Вирусоподобные частицы на основе SpyCatcher-AP205, связанные со слитым белком SpyTag-антиген (SEQ ID NO: 82), также являются монодисперсными и имеют размер, составляющий 75 нм, что на 33 нм больше по сравнению с соответствующими несвязанными VLP на основе SpyCatcher-AP205;

фиг. 11 - экспрессия VLP на основе AP205. Левая секция: SDS-PAGE для VLP на основе AP205 (SEQ ID NO: 58). SDS-PAGE показывает, что белки оболочки имеют массу от 12 до 22 кДа (теоретический размер составляет 14 кДа). Правая секция: трансмиссионная электронная микроскопия вирусоподобных частиц на основе AP205. На ТЕМ-изображении показаны неагрегированные VLP размером примерно 30 нм, собранные из AP205 (SEQ ID NO: 58);

фиг. 12 - связывающая способность AP205-SpyTag в сравнении со SpyTag-AP205. SDS-PAGE для AP205-SpyTag (SEQ ID NO: 64(65)) и SpyTag-AP205 (SEQ ID NO: 62(63)), связанных со слитым белком SpyC-антиген (SEQ ID NO: 19). Обе VLP связываются в молярном отношении 1:2 (VLP к Ag), и гель SDS-PAGE показывает, что SpyTag-AP205 характеризуется лучшей связывающей способностью по сравнению с AP205-SpyTag;

фиг. 13 - связывающая способность SpyTag-AP205-SpyTag (SAS) в сравнении с SpyTag-AP205 (SA): (слева) SDS-PAGE для VLP на основе SpyTag-AP205-SpyTag (SAS) (SEQ ID NO: 71(72)), дорожка 1, VLP на основе SpyTag-AP205 (SA) (SEQ ID NO: 62), дорожка 2, и VLP AP205, дорожка 3 (SEQ ID NO: 58), связанных в молярном отношении 1:1 со слитым белком SpyCatcher-антиген (SEQ ID NO: 19);

фиг. 14 - связывание Pfs25 с вирусоподобными частицами на основе SpyTag-AP205-SpyTag. Изображение геля от SDS-PAGE в восстановительных условиях для VLP на основе SpyTag-AP205-SpyTag (SEQ ID NO: 71(72)), дорожка 1; SpyTag-AP205-SpyTag и Pfs25 (SEQ ID NO: 27) в молярном отношении 1:1, дорожка 2; VLP на основе AP205 (SEQ ID NO: 58) и Pfs25 (SEQ ID NO: 27) в молярном отношении 1:1, дорожка 3;

фиг. 15 - индукция высоких титров антител в результате экспонирования с помощью VLP. На фигуре показан ответ в виде выработки Ig против антигена (SEQ ID NO: 7) через две недели после иммунизации по схеме примирование-бустер-иммунизация-бустер-иммунизация. Пунктирными линиями представлены отдельные мыши, иммунизированные SpyCatcher-AP205 (SEQ ID NO: 76), связанным со слитым белком SpyTag-антиген (SEQ ID NO: 7). Серыми линиями представлены отдельные мыши, иммунизированные растворимым слитым белком SpyTag-антиген (SEQ ID NO: 7) и AP205 (SEQ ID NO: 58), который является неспособным к связыванию с антигеном. Обе вакцины были составлены без геля гидроксида алюминия. Ось X: разведение сыворотки; ось Y: OD (оптическая плотность) при 490 нм;

фиг. 16 - показан ответ в виде выработки Ig против антигена (SEQ ID NO: 27) через три месяца после иммунизации по схеме примирование-бустер-иммунизация-бустер-иммунизация. Пунктирной линией представлены отдельные мыши, иммунизированные SpyTag-AP205-SpyT (SEQ ID NO: 71), связанным со слитым белком SpyCatcher-антиген (SEQ ID NO: 27). Серой линией представлены отдельные мыши, иммунизированные растворимым слитым белком SpyCatcher-антиген (SEQ ID NO: 27) и AP205 (SEQ ID NO: 58), который является неспособным к связыванию с антигеном. Обе вакцины были составлены с гелем гидроксида алюминия. Ось X: разведение сыворотки; ось Y: OD при 490 нм;

фиг. 17 - авидность антител, образование которых индуцировалось у мышей после иммунизации по схеме примирование-бустер-иммунизация-бустер-иммунизация. Мышиные антисыворотки получали через четыре месяца после последней иммунизации. Черным столбиком представлен пул сывороток от мышей, иммунизированных SpyTag-AP205-SpyTag (SEQ ID NO: 71), связанным со слитым белком SpyCatcher-антиген (SEQ ID NO: 27). Серым столбиком представлен пул сывороток от мышей, иммунизированных растворимым слитым белком SpyCatcher-антиген (SEQ ID NO: 27) и AP205 (SEQ ID NO: 58), который является неспособным к связыванию с антигеном. Обе вакцины были составлены с гелем гидроксида алюминия;

фиг. 18 - авидность антител, образование которых индуцировалось у мышей после иммунизации по схеме примирование-бустер-иммунизация-бустер-иммунизация. Мышиные антисыворотки получали через три месяца после последней иммунизации. Черным столбиком представлен пул сывороток от мышей, иммунизированных SpyCatcher-AP205 (SEQ ID NO: 76), связанным со слитым белком SpyTag-антиген (SEQ ID NO: 7). Серым столбиком представлен пул сывороток от мышей, иммунизированных растворимым слитым белком SpyTag-Ag (SEQ ID NO: 7) и AP205 (SEQ ID NO: 58), который является неспособным к связыванию с антигеном. Обе вакцины были составлены без геля гидроксида алюминия;

фиг. 19 - ответ в виде выработки Ig против антигена (SEQ ID NO: 52) после однократной иммунизации. Пунктирными линиями представлены отдельные мыши, иммунизированные SpyTag-AP205 (SEQ ID NO: 62), связанным со слитым белком SpyCatcher-антиген (SEQ ID NO: 52). Серыми линиями представлены отдельные мыши, иммунизированные растворимым слитым белком SpyCatcher-антиген (SEQ ID NO: 52) и AP205 (SEQ ID NO: 58), который является неспособным к связыванию с антигеном. Обе вакцины были составлены с гелем гидроксида алюминия. Ось X: разведение сыворотки; ось Y: OD при 490 нм;

фиг. 20 - показан ответ в виде выработки Ig против антигена (SEQ ID NO: 27) после однократной иммунизации. Пунктирными линиями представлены отдельные мыши, иммунизированные SpyTag-AP205-SpyTag (SEQ ID NO: 71), связанным со слитым белком SpyCatcher-антиген (SEQ ID NO: 27). Серыми линиями представлены отдельные мыши, иммунизированные растворимым слитым белком SpyCatcher-антиген (SEQ ID NO: 27) и AP205 (SEQ ID NO: 58), который является неспособным к связыванию с антигеном. Обе вакцины были составлены с гелем гидроксида алюминия. Ось X: разведение сыворотки; ось Y: OD при 490 нм;

фиг. 21 - нарушение аутоотолерантности в результате экспонирования на VLP. На фигуре показан ответ в виде выработки Ig против аутоантигена IL-5 (SEQ ID NO: 19) через пять месяцев после иммунизации по схеме примирование-бустер-иммунизация-бустер-иммунизация. Пунктирной линией представлены отдельные мыши, иммунизированные SpyTag-AP205-SpyTag (SEQ ID NO: 71), связанным со слитым белком SpyCatcher-аутоантиген IL-5 (SEQ ID NO: 19). Серой линией представлены отдельные мыши, иммунизированные растворимым слитым белком SpyCatcher-антиген (SEQ ID NO: 19) и AP205 (SEQ ID NO: 58), который является неспособным к связыванию со слитым белком spycatcher-антиген. Обе вакцины были составлены в геле гидроксида алюминия. Ось X: разведение сыворотки; ось Y: OD при 490 нм;

фиг. 22 - показан ответ в виде выработки Ig против аутоантигена CTLA-4 (SEQ ID NO: 11) через две недели после иммунизации по схеме примирование-бустер-иммунизация. Пунктирной линией представлены отдельные мыши, иммунизированные SpyTag-AP205-SpyTag (SEQ ID NO: 71), связанным с аутоантигеном CTLA-4 (SEQ ID NO: 11). Серой линией представлены отдельные мыши, иммунизированные растворимым слитым белком SpyCatcher-антиген (SEQ ID NO: 11) и AP205 (SEQ ID NO: 58), который является неспособным к связыванию со слитым белком spycatcher-антиген. Обе вакцины были составлены в геле гидроксида алюминия. Ось X: разведение сыворотки; ось Y: OD при 490 нм;

фиг. 23 - нарушение аутоотолерантности в результате экспонирования на VLP. На фигуре показан ответ в виде выработки Ig против аутоантигена PD-L1 (SEQ ID NO: 9) через две недели после иммунизации по схеме примирование-бустер-иммунизация. Пунктирной линией представлены отдельные мыши, иммунизированные SpyTag-AP205-SpyTag (SEQ ID NO: 71), связанным с аутоантигеном PD-L1 (SEQ ID NO: 9). Серой линией представлены отдельные мыши, иммунизированные растворимым аутоантигеном (SEQ ID NO: 9) и AP205 (SEQ ID NO: 58), который является неспособным к связыванию со слитым белком SpyCatcher-антиген. Обе вакцины были составлены в геле гидроксида алюминия. Ось X: разведение сыворотки; ось Y: OD при 490 нм;

фиг. 24 - иммунизация вакциной на основе VLP против Pfs25 приводила в результате к индукции выработки функциональных антител, которые были способны блокировать передачу паразитов *Plasmodium falciparum* in vitro. Мышей иммунизировали два раза 2,5 мкг либо А) слитым белком spycatcher-антиген Pfs25 (SEQ ID NO: 27), экспонируемым на VLP на основе SpyTag-AP205-SpyT (SEQ ID NO: 71), либо В) растворимым слитым белком spycatcher-антиген Pfs25 (SEQ ID NO: 27), смешанным с VLP на основе AP205 (SEQ ID NO: 58), которая является неспособной к связыванию/экспонированию антигена. Обе вакцины были составлены с гелем гидроксида алюминия. Эффективность блокирования передачи для антител оценивали с помощью стандартного анализа с кормлением комаров через мембрану (SMFA) с использованием очищенного IgG из иммунной сыворотки;

фиг. 25 - антигенспецифичное качественное исследование индуцированных иммунных реакций.

Исследование платформы SpyCatcher-VLP для индукции VAR2CSA-специфичных антител.

В анализе ингибирования связывания с паразитом показано нормализованное связывание с паразитом после инкубирования с объединенными антисыворотками (3-кратные разведения, начиная с 1:20) от мышей (n=5), вакцинированных слитым белком SpyTag-ID1ID2a (SEQ ID NO: 82), конъюгированным со SpyCatcher-VLP (SEQ ID NO: 76), или растворимым слитым белком SpyTag-ID1ID2a (SEQ ID NO: 82), смешанным с немодифицированными VLP на основе AP205 (SEQ ID NO: 58). Результаты связывания с паразитом показаны после первой (▲), второй (■) и третьей (●) иммунизации. В анализе показано, что антисыворотки от мышей, иммунизированных слитым белком SpyTag-ID1ID2a, конъюгированным с VLP (SEQ ID NO: 82), характеризовались большей способностью к ингибированию связывания по сравнению с антисыворотками от мышей, иммунизированных растворимым слитым белком SpyTag-ID1ID2a (SEQ ID NO: 82).

Подробное раскрытие изобретения

Изобретением решается задача конъюгирования белков больших размеров (например, полноразмерных антигенов) с высокой плотностью и в соответствующей ориентации на поверхности VLP, в результате чего получают VLP, презентующие плотные и повторяющиеся массивы гетерологичных эпитопов. Решение в соответствии с настоящим изобретением представляет собой новый подход к созданию универсальной платформы для доставки в виде вакцины на основе VLP, способной эффективно экспонировать антигенные эпитопы и индуцировать длительный защитный иммунитет.

Общий вид настоящего изобретения проиллюстрирован на фиг. 1.

Определения.

Термин "вирусоподобная частица" или "VLP" относится к одному или нескольким рекомбинантно экспрессируемым вирусным белкам капсида, которые самопроизвольно собираются в макромолекулярные структуры по типу частиц, имитирующие морфологию оболочки вируса, но лишенные инфекционного генетического материала.

Термин "самосборка" относится к процессу, при котором система из уже существующих компонентов в конкретных условиях принимает более организованную структуру посредством взаимодействий между самими компонентами. В данном контексте самосборка относится к характерной способности белка капсида AP205 и/или белка капсида фага f1 к самосборке в вирусоподобные частицы в отсутствие других вирусных белков под воздействием конкретных условий. "Самосборка" не исключает возможности того, что клеточные белки, например шапероны, принимают участие в процессе внутриклеточной сборки VLP. Процесс самосборки может быть чувствительным и тонким, и на него могут оказывать влияние такие факторы, как например, без ограничения, выбор хозяина экспрессии, выбор условий экспрессии и условий для созревания вирусоподобных частиц. Белки капсида вируса могут быть способны образовывать VLP самостоятельно или в комбинации с несколькими белками капсида вируса, причем все они необязательно являются идентичными. Примеры белков капсида вируса включают в себя, без ограничения, белок капсида AP205 и/или белок капсида фага f1.

Используемый в данном документе термин "соответствующая ориентация" относится к ориентации конструкций целевого антигена согласно настоящему изобретению и их пространственной ориентации относительно белка капсида AP205 и/или белка капсида фага f1 согласно настоящему изобретению. При связывании антигена, слитого со SpyCatcher, с VLP на основе AP205 и/или VLP на основе фага f1, экспонирующих SpyTag, молекула меченого SpyCatcher вакцинного антигена может быть связана только с одним белком капсида AP205 и/или белком капсида фага f1 в уникальных сайтах как на вакцинном антигене, так и на рекомбинантном белке капсида AP205 и/или рекомбинантном белке капсида фага f1, таким образом создавая равномерное и/или соответствующее презентирование указанного антигена в соответствующей ориентации. В отличие от этого, например, стрептавидиновый гомотетрамер может перекрестно связывать несколько белков капсида AP205 и/или рекомбинантных белков капсида фага f1 на поверхности биотинилированной VLP, таким образом создавая неравномерную и несоответствующую ориентацию указанного антигена (Chackerian B. et al., 2008). Помимо этого, очень затруднительным является применение стрептавидаина в качестве образующей мостик молекулы, например, для конъюгирования биотинилированных антигенов на биотинилированных VLP, поскольку многочисленные сайты связывания биотина будут обеспечивать возможность перекрестного связывания и агрегации биотинилированных VLP.

Используемый в данном документе термин "расположены с равномерным интервалом" относится к антигенам согласно настоящему изобретению, которые образуют паттерн на поверхности VLP. Такой паттерн может представлять собой симметричный, кольцеподобный и/или букетоподобный паттерн антигенов.

Термин "лечение" относится к ликвидации проблемы со здоровьем. Лечение также может быть превентивным и/или профилактическим или может снижать риск возникновения заболевания и/или инфекции. Лечение также может быть радикальным или может ослаблять заболевание и/или инфекцию.

Термин "профилактика" относится к снижению риска возникновения заболевания и/или инфекции. Профилактика также может относиться к предупреждению возникновения заболевания и/или инфекции.

Термин "петля" относится ко вторичной структуре полипептида, при которой полипептидная цепь меняет свое общее направление на обратное, и она также может называться поворотом.

Термин "коктейль вакцин" относится к смеси антигенов, вводимых вместе. Коктейль вакцин можно вводить в виде одной дозы или в виде нескольких доз, вводимых в течение периода времени. Временные интервалы могут представлять собой введения в пределах того же года, месяца, недели, суток, часа и/или минуты, но не ограничиваются этим. Термины "совместная вакцинация" и "коктейль вакцин" можно использовать взаимозаменяемо.

Термин "аутоантигены" относится к эндогенным антигенам, которые образовались в ранее нормальных клетках в результате нормального клеточного метаболизма.

Термин "SpyTag" относится к части CnaB2 домена из белка FbaB из *Streptococcus pyogenes*, оптимизированной для связывания со SpyCatcher, состоящей из другой части CnaB2 домена. Взаимодействие происходит, когда непротонированный амин Lys31 атакует углерод карбонила Asp117 по нуклеофильному механизму, причем реакцию катализирует соседний Glu77. Минимальный пептид для опосредования этого связывания представляет собой AHIVMVDA, тогда как удлинение с С-конца, дающее последовательность: AHIVMVDA_{YKPTK}, обеспечивает наиболее оптимальный участок, обозначенный "SpyTag" (Zakeri B. et al., PNAS, 2012).

Термин "SpyCatcher" относится к части CnaB2 домена из белка FbaB из *Streptococcus pyogenes*, оптимизированной для связывания со SpyTag, состоящей из другой части CnaB2 домена. SpyCatcher может представлять собой остатки номер 1-113 в CnaB2, и связывание может быть оптимизировано посредством следующих двух мутаций: I34E и M69Y (Zakeri B. et al., PNAS, 2012). Усеченные и гомологичные варианты SpyCatcher также являются объектами настоящего изобретения, и, следовательно, термином SpyCatcher в данном документе обозначается любой вариант SpyCatcher, который все еще является способным ко взаимодействию со SpyTag. Варианты SpyCatcher могут включать в себя усеченные варианты SpyCatcher, но не ограничиваются ими. Усеченные варианты SpyCatcher могут включать в себя, без ограничения, SEQ ID NO: 60 и SEQ ID NO: 61.

Термин "вариант последовательности" относится к полипептидной и/или полинуклеотидной последовательности, которая по меньшей мере на 70%, как например, на 75%, как например, на 80%, как например, на 85%, как например, на 90%, как например, на 95%, как например, на 96%, как например, на 97%, как например, на 98%, как например, на 99%, как например, на 99,5%, как например, на 100% идентична указанной полипептидной и/или полинуклеотидной последовательности.

Используемый в данном документе термин "пептидная метка" относится к пептидной последовательности, которая привита с помощью генетических методов на рекомбинантный белок. Первая пептидная метка может облегчать взаимодействия со второй пептидной меткой, например, посредством образования одной или нескольких ковалентных связей, таких как изопептидные связи. В соответствии с вариантом осуществления первая пептидная метка, описанная в настоящем изобретении, содержит SpyTag, которая описана в данном документе. В соответствии с вариантом осуществления первая пептидная метка, описанная в настоящем изобретении, содержит KTag, которая описана в данном документе. В соответствии с вариантом осуществления вторая пептидная метка, описанная в настоящем изобретении, содержит KTag, которая описана в данном документе. В соответствии с вариантом осуществления вторая пептидная метка, описанная в настоящем изобретении, содержит SpyCatcher, которая описана в данном документе. В соответствии с вариантом осуществления вторая пептидная метка, описанная в настоящем изобретении, содержит SpyTag, которая описана в данном документе.

Вакцина на основе VLP.

Экспрессия вирусных структурных белков, таких как белки оболочки или капсида, может приводить в результате к самосборке вирусоподобных частиц (VLP). VLP напоминают вирусы, но являются неинфекционными, поскольку они не содержат какого-либо вирусного генетического материала. В контексте активной иммунизации VLP доказали высокую иммуногенность и обеспечивают потенциально более безопасную альтернативу аттенуированным вирусам, поскольку они лишены генетического материала. Помимо этого, VLP представляют собой полезный инструмент для разработки вакцин, и их можно применять в качестве молекулярных остовов для эффективного экспонирования антигенных эпитопов. Оно достигалось либо посредством генетической вставки, либо посредством подходов химической конъюгации. Тем не менее, в целом, не представлялось возможным встраивание пептидов длиннее чем 20 аминокислот без нарушения процесса самосборки химерной VLP. В то же время, современные технологии, в которых применяется химическая конъюгация, не являются достаточными для обеспечения возможности презентирования с помощью VLP антигенов большего размера с высокой плотностью и в соответствующей ориентации для обеспечения упорядоченного экспонирования повторяющихся антигенных эпитопов при высокой плотности, что является критически важными факторами для получения сильных и длительных иммунных реакций.

Данные проблемы были решены авторами настоящего изобретения с помощью нового подхода к связыванию антигенов с белком капсида вируса, таким как белок капсида AP205 и/или белок капсида фага ϕ t, в VLP с применением слияния со SpyTag и SpyCatcher без нарушения самосборки VLP. Таким образом, в основном аспекте, проиллюстрированном на фиг. 1, настоящее изобретение относится к вакцине для применения в профилактике и/или лечении заболевания, причем вакцина содержит:

- i) белок капсида вируса, содержащий по меньшей мере одну первую пептидную метку, и

ii) антиген, слитый со второй пептидной меткой, причем антиген и белок капсида вируса связаны посредством изопептидной связи между первой и второй пептидной меткой, и при этом i-ii образуют вирусоподобную частицу, экспонирующую указанный антиген.

В соответствии с вариантом осуществления первая пептидная метка содержит по меньшей мере одну SpyCatcher, и вторая пептидная метка содержит SpyTag, причем антиген и белок капсида вируса связаны посредством взаимодействия между SpyCatcher и SpyTag, и при этом i-ii образуют вирусоподобную частицу, экспонирующую указанный антиген.

В соответствии с вариантом осуществления первая пептидная метка содержит две SpyCatcher. Таким образом, в соответствии с одним вариантом осуществления две SpyCatcher являются слитыми с белком капсида AP205, по одной на каждом конце.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления SpyCatcher является слитой с белком капсида через спейсер. В соответствии с одним вариантом осуществления SpyCatcher является слитой с белком капсида AP205 через спейсер. Подходящие спейсеры являются известными в уровне техники и включают в себя такие спейсеры, как Gly-Gly-Ser-Gly-Ser (SEQ ID NO: 83).

В соответствии с вариантом осуществления белок капсида вируса представляет собой белок капсида AP205, и первая пептидная метка представляет собой SpyCatcher, причем SpyCatcher связана с N-концом белка капсида AP205.

В соответствии с вариантом осуществления первая пептидная метка содержит по меньшей мере одну Spytag, и вторая пептидная метка содержит SpyCatcher, причем антиген и белок капсида вируса связаны посредством взаимодействия между SpyCatcher и SpyTag, и при этом i-ii образуют вирусоподобную частицу, экспонирующую указанный антиген.

В соответствии с вариантом осуществления первая пептидная метка содержит две SpyTag. Таким образом, в соответствии с одним вариантом осуществления две SpyTag являются слитыми с белком капсида AP205, по одной на каждом конце.

В соответствии с другим вариантом осуществления первая пептидная метка содержит SpyTag, и вторая пептидная метка содержит KTag, и при этом вакцина необязательно содержит SpyLigase, и при этом антиген и белок капсида вируса связаны посредством взаимодействия между SpyTag и KTag, и при этом i-ii образуют вирусоподобную частицу, экспонирующую указанный антиген.

В соответствии с дополнительным вариантом осуществления первая пептидная метка представляет собой SpyTag, и вторая пептидная метка представляет собой KTag.

В соответствии с другим вариантом осуществления первая пептидная метка содержит KTag, и вторая пептидная метка содержит SpyTag, и при этом вакцина необязательно содержит SpyLigase, причем антиген и белок капсида вируса связаны посредством взаимодействия между KTag и SpyTag, и при этом i-ii образуют вирусоподобную частицу, экспонирующую указанный антиген.

В соответствии с другим вариантом осуществления белок капсида вируса содержит или представляет собой белок капсида AP205 и/или белок капсида fаgа fг.

В соответствии с вариантом осуществления первая пептидная метка, которая описана в данном документе, является слитой с N- и/или C-концом белка капсида AP205 и/или белка капсида fг.

В соответствии с вариантом осуществления по меньшей мере одна первая пептидная метка, которая описана в данном документе, является слитой с N- и/или C-концом белка капсида AP205 и/или белка капсида fг через спейсер.

В соответствии с вариантом осуществления первая пептидная метка, которая описана в данном документе, является слитой с N-концом белка капсида AP205.

В соответствии с вариантом осуществления первая пептидная метка, которая описана в данном документе, является слитой с C-концом белка капсида AP205. В соответствии с вариантом осуществления пептидная метка, слитая с C-концом AP205, не представляет собой SpyCatcher.

В соответствии с вариантом осуществления по меньшей мере одна первая пептидная метка, которая описана в данном документе, представляет собой две первые пептидные метки, причем две пептидные метки являются идентичными, и при этом одна из двух пептидных меток является слитой с N-концом белка капсида AP205, а другая является слитой с C-концом белка капсида AP205. В соответствии с одним вариантом осуществления две первые пептидные метки представляют собой две SpyTag.

В соответствии с вариантом осуществления первая пептидная метка, которая описана в данном документе, является слитой с N-концом белка капсида fг.

В соответствии с вариантом осуществления первая пептидная метка, которая описана в данном документе, является слитой с C-концом белка капсида fг.

В соответствии с вариантом осуществления первая пептидная метка содержит SpyTag, SpyCatcher и/или KTag, которые описаны в данном документе. В соответствии с дополнительным вариантом осуществления первая пептидная метка представляет собой SpyTag, SpyCatcher и/или KTag, которые описаны в данном документе.

В соответствии с одним вариантом осуществления в случае, когда первая пептидная метка представляет собой SpyCatcher, слияние с белком капсида осуществляется через N-конец указанного белка

капсида.

В соответствии с другим вариантом осуществления указанное взаимодействие предусматривает взаимодействие, основанное на образовании изопептидной связи. В соответствии с другим вариантом осуществления SpyTag и KTag согласно любому из предыдущих пунктов связаны посредством SpyLigase.

В соответствии с основным аспектом настоящее изобретение относится к вакцине для применения в профилактике и/или лечении заболевания, причем вакцина содержит:

- i) белок капсида AP205 и/или белок капсида фага fr, содержащие SpyCatcher, и
- ii) антиген, слитый со SpyTag,

причем антиген и AP205 и/или фаг fr необратимо связаны посредством спонтанного образования изопептидной связи между Spytag и SpyCatcher, и при этом i-ii образуют вирусоподобную частицу, экспонирующую указанный антиген. В соответствии с дополнительным аспектом SpyCatcher является слитой с N-концом белка капсида AP205.

В соответствии с вариантом осуществления настоящее изобретение относится к вакцине для применения в профилактике и/или лечении заболевания, причем вакцина содержит:

- i) белок капсида AP205 и/или белок капсида фага fr, содержащие SpyCatcher и имеющие полипептидную последовательность, по меньшей мере на 70%, как например, на 75%, как например, на 80%, как например, на 85%, как например, на 90%, как например, на 95%, как например, на 96%, как например, на 97%, как например, на 98%, как например, на 99%, как например, на 99,5%, как например, на 100% идентичную полипептидной последовательности SEQ ID NO: 76, и
- ii) антиген, слитый со SpyTag,

причем антиген и AP205 и/или фаг fr необратимо связаны посредством спонтанного образования изопептидной связи между Spytag и SpyCatcher, и при этом i-ii образуют вирусоподобную частицу, экспонирующую указанный антиген.

В соответствии с другим основным аспектом, который проиллюстрирован на фиг. 1, настоящее изобретение относится к вакцине для применения в профилактике и/или лечении заболевания, причем вакцина содержит:

- i) белок капсида AP205 и/или белок капсида фага fr, содержащие SpyTag, и
- ii) антиген, слитый со SpyCatcher,

причем антиген и белок капсида AP205 и/или белок капсида фага fr необратимо связаны посредством спонтанного образования изопептидной связи между Spytag и SpyCatcher, и при этом i-ii образуют вирусоподобную частицу, экспонирующую указанный антиген.

В соответствии с вариантом осуществления белок капсида AP205 и/или белок капсида фага fr, содержащие SpyTag, являются способными к образованию вирусоподобной частицы.

Авторами настоящего изобретения было продемонстрировано образование VLP на основе AP205 при рекомбинантной экспрессии белка капсида AP205, предпочтительно в клетках *Escherichia coli*, как например, в BL21 клетках. Другие условия и хозяева экспрессии (такие как *Saccharomyces cerevisiae* или *Pichia Pastoris*) могут работать с тем же успехом.

В соответствии с вариантом осуществления антиген способен вызывать иммунную реакцию у животного, такого как млекопитающее, как например, у коровы, свиньи, лошади, овцы, козы, ламы, мыши, крысы, обезьяны, наиболее предпочтительно, к человека; или у птицы, такой как курица, или у рыбы, такой как лосось.

В течение длительного периода привлекательной целью являлось использование VLP в качестве платформы для усиления иммуногенности для индукции иммунных реакций в отношении гетерологичных антигенов посредством применения VLP в качестве молекулярных остовов для экспонирования антигенов. Таким образом, еще один аспект настоящего изобретения относится к остоу для экспонирования антигена, содержащему собранную вирусоподобную частицу, содержащую:

- i) белок капсида AP205 и/или белок капсида фага fr, содержащие SpyCatcher, и
- ii) антиген, слитый со SpyTag,

причем антиген и белок капсида AP205 и/или белок капсида фага fr связаны посредством спонтанного образования изопептидной связи между Spytag и SpyCatcher, и при этом i-ii образуют остов для экспонирования антигена. В соответствии с дополнительным аспектом SpyCatcher является слитой с N-концом белка капсида AP205.

Таким образом, еще один аспект настоящего изобретения относится к остоу для экспонирования антигена, содержащему собранную вирусоподобную частицу, содержащую:

- i) белок капсида AP205 и/или белок капсида фага fr, содержащие SpyTag, и
- ii) антиген, слитый со SpyCatcher,

причем антиген и белок капсида AP205 и/или белок капсида фага fr связаны посредством спонтанного образования изопептидной связи между Spytag и SpyCatcher, и при этом i-ii образуют остов для экспонирования антигена.

Еще один аспект настоящего изобретения относится к способу получения не встречающегося в естественных условиях, упорядоченного и повторяющегося массива антигенов, содержащего:

- i) белок капсида AP205 и/или белок капсида фага fr, содержащие SpyCatcher, и
- ii) антиген, слитый со SpyTag,

причем антиген и белок капсида AP205 и/или белок капсида фага fr связаны посредством спонтанного образования изопептидной связи между Spytag и SpyCatcher, и при этом i-ii образуют не встречающийся в естественных условиях, упорядоченный и повторяющийся массив антигенов. В соответствии с дополнительным аспектом SpyCatcher является слитой с N-концом белка капсида.

Еще один аспект настоящего изобретения относится к способу получения не встречающегося в естественных условиях, упорядоченного и повторяющегося массива антигенов, содержащего:

- i) белок капсида AP205 и/или белок капсида фага fr, содержащие по меньшей мере одну SpyTag, и
- ii) антиген, слитый со SpyCatcher,

причем антиген и белок капсида AP205 и/или белок капсида фага fr связаны посредством спонтанного образования изопептидной связи между Spytag и SpyCatcher, и при этом i-ii образуют не встречающийся в естественных условиях, упорядоченный и повторяющийся массив антигенов.

Заболевания и медицинские показания.

Настоящее изобретение представляет собой новый, универсальный и простой в применении подход для конъюгирования различных антигенов с VLP. В зависимости от антигена вакцины на основе VLP согласно настоящему изобретению можно применять для профилактики и/или лечения широкого спектра заболеваний. Заболевания, для профилактики и/или лечения которых можно применять настоящее изобретение, включают в себя, без ограничения, злокачественные опухоли, сердечно-сосудистые заболевания, аллергические заболевания, хронические заболевания, неврологические заболевания и/или инфекционные заболевания.

В соответствии с вариантом осуществления антиген, который ассоциирован по меньшей мере с одной злокачественной опухолью, связан с белком капсида вируса, таким как белок капсида AP205 и/или белок капсида фага fr, посредством взаимодействия между SpyCatcher и SpyTag. В соответствии с дополнительным вариантом осуществления данную вакцину на основе VLP можно применять для профилактики и/или лечения злокачественной опухоли и/или злокачественных опухолей, с которыми ассоциирован антиген.

В соответствии с вариантом осуществления антиген, который ассоциирован по меньшей мере с одним сердечно-сосудистым заболеванием, связан с белком капсида вируса, таким как белок капсида AP205 и/или белок капсида фага fr, посредством взаимодействия между SpyCatcher и SpyTag. В соответствии с дополнительным вариантом осуществления данную вакцину на основе VLP можно применять для профилактики и/или лечения сердечно-сосудистого заболевания и/или сердечнососудистых заболеваний, с которыми ассоциирован антиген.

В соответствии с вариантом осуществления антиген, который ассоциирован по меньшей мере с одним аллергическим заболеванием, связан с белком капсида вируса, таким как белок капсида AP205 и/или белок капсида фага fr, посредством взаимодействия между SpyCatcher и SpyTag. В соответствии с дополнительным вариантом осуществления данную вакцину на основе VLP можно применять для профилактики и/или лечения аллергического заболевания и/или аллергических заболеваний, с которыми ассоциирован антиген.

В соответствии с вариантом осуществления антиген, который ассоциирован по меньшей мере с одним инфекционным заболеванием, связан с белком капсида вируса, таким как белок капсида AP205 и/или белок капсида фага fr, посредством взаимодействия между SpyCatcher и SpyTag. В соответствии с дополнительным вариантом осуществления данную вакцину на основе VLP можно применять для профилактики и/или лечения инфекционного заболевания и/или инфекционных заболеваний, с которыми ассоциирован антиген.

В соответствии с вариантом осуществления антиген, который ассоциирован по меньшей мере с одним хроническим заболеванием, связан с белком капсида вируса, таким как белок капсида AP205 и/или белок капсида фага fr, посредством взаимодействия между SpyCatcher и SpyTag. В соответствии с дополнительным вариантом осуществления данную вакцину на основе VLP можно применять для профилактики и/или лечения хронического заболевания и/или хронических заболеваний, с которыми ассоциирован антиген.

В соответствии с вариантом осуществления антиген, который ассоциирован по меньшей мере с одним неврологическим заболеванием, связан с белком капсида вируса, таким как белок капсида AP205 и/или белок капсида фага fr, посредством взаимодействия между SpyCatcher и SpyTag. В соответствии с дополнительным вариантом осуществления данную вакцину на основе VLP можно применять для профилактики и/или лечения неврологического заболевания и/или неврологических заболеваний, с которыми ассоциирован антиген.

Неполный перечень антигенов, которые можно применять в соответствии с настоящим изобретением, изложен в табл.1 и 2. Кроме того, в табл. 1 приведены примеры конкретных заболеваний, с которыми ассоциированы антигены, а также примеры групп пациентов, которые могут испытывать потребность в профилактике и/или лечении с применением вакцин на основе комплекса антиген-VLP в соответствии с настоящим изобретением.

Таблица 1. Неполный перечень антигенов или их частей, которые можно применять в лечении конкретных заболеваний/при медицинских показаниях в различных группах пациентов

Примеры антигенов (не исчерпывающие)	Примеры конкретного заболевания (не исчерпывающие)	Примеры групп пациентов (не исчерпывающие)
Her2/Neu (ERBB2)	Злокачественная опухоль молочной железы	Женщины, сверхэкспрессирующие Her2
Her2/Neu (ERBB2)	Злокачественная опухоль желудка	Мужчины и женщины, сверхэкспрессирующие Her2
Her2/Neu (ERBB2)	Злокачественная опухоль яичника	Женщины, сверхэкспрессирующие Her2
Her2/Neu (ERBB2)	Серозная карцинома матки	Женщины в постменопаузальном периоде, сверхэкспрессирующие Her2
Сурвивин	Типы злокачественных опухолей, сверхэкспрессирующие сурвивин	Мужчины и небеременные женщины, сверхэкспрессирующие сурвивин
PCSK9	Сердечно-сосудистое заболевание	Мужчины и женщины с дислипидемией
PCSK9	Сердечно-сосудистое заболевание	Мужчины и женщины с атеросклерозом
PCSK9	Сердечно-сосудистое заболевание	Мужчины и женщины с гиперхолестеринемией
Интерлейкин-5	Астма	Мужчины и женщины с эозинофилией
Интерлейкин-5	Полипоз носа	Мужчины и женщины с эозинофилией
Интерлейкин-5	Атопический дерматит	Мужчины и женщины с эозинофилией
Интерлейкин-5	Эозинофильный эзофагит	Мужчины и женщины с эозинофилией
Интерлейкин-5	Гиперэозинофильный синдром	Мужчины и женщины с эозинофилией
Интерлейкин-5	Синдром Черджа-Стросса	Мужчины и женщины с эозинофилией
Ag85A	Туберкулез	Мужчины и женщины с туберкулезом
PfRH5	Малярия	Мужчины и женщины с малярией
VAR2CSA	Малярия	Женщины с малярией
PfEMP1, CIDR1a	Малярия	Мужчины и женщины с малярией
GLURP	Малярия	Мужчины и женщины с малярией
MSP3	Малярия	Мужчины и женщины с малярией
Pfs25	Малярия	Мужчины и женщины с малярией
CSP	Малярия	Мужчины и женщины с малярией
PfSEA-1	Малярия	Мужчины и женщины с малярией
Гемагглютинин HA	Грипп	Мужчины и женщины с гриппом
Интерлейкин-17	Псориаз	Мужчины и женщины с псориазом
Интерлейкин-17	Рассеянный склероз	Мужчины и женщины с рассеянным склерозом
Интерлейкин-17	Ревматоидный артрит	Мужчины и женщины с ревматоидным артритом
Интерлейкин-17	Воспалительные заболевания кишечника	Мужчины и женщины с воспалительными заболеваниями кишечника
Интерлейкин-17	Астма	Мужчины и женщины с астмой
IL-33	Астма	Мужчины и женщины с астмой
IgE	Астма	Мужчины и женщины с астмой
Gp160	HIV (ВИЧ)	Мужчины и женщины с HIV
Gp120	HIV (ВИЧ)	Мужчины и женщины с HIV
Gp40	HIV (ВИЧ)	Мужчины и женщины с HIV
GD2	Типы клеток злокачественных	Мужчины и женщины с опухолями, экспрессирующими GD2

	опухолей, экспрессирующие GD2 (например, меланомы, остеосаркома и саркомы мягких тканей)	
EGF-R	Типы клеток злокачественных опухолей, экспрессирующие EGF-R (например, метастатическая злокачественная опухоль ободочной и прямой кишки и злокачественная опухоль головы и шеи)	Мужчины и женщины с опухолями, экспрессирующими EGF-R
CEA	Типы клеток злокачественных опухолей, экспрессирующие CEA (например, злокачественная опухоль толстой и прямой кишки или злокачественная опухоль поджелудочной железы, молочной железы, яичника или легкого)	Мужчины и женщины с опухолями, экспрессирующими CEA
CD52	Хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL), кожная Т-клеточная лимфома (CTCL) и Т-клеточная лимфома или рассеянный склероз	Мужчины и женщины с хроническим лимфоцитарным лейкозом (CLL), кожной Т-клеточной лимфомой (CTCL) и Т-клеточной лимфомой или рассеянным склерозом
CD21	В-клеточные злокачественные опухоли	Мужчины и женщины с В-клеточными злокачественными опухолями
Белок меланомы человека gp100	Типы клеток злокачественных опухолей, экспрессирующие белок меланомы человека gp 100 (например, меланома).	Мужчины и женщины с меланомой

Белок меланомы человека melan-A/MART-1	Типы клеток злокачественных опухолей, экспрессирующие белок меланомы человека melan-A/MART-1 (например, меланома).	Мужчины и женщины с меланомой
Тирозиназа	Меланома	Мужчины и женщины с меланомой
Белок NA17-A nt	Меланома	Мужчины и женщины с меланомой
Белок MAGE-3	Меланома, немелкоклеточная злокачественная опухоль легкого, гематологические злокачественные опухоли	Мужчины и женщины с меланомой, немелкоклеточной злокачественной опухолью легкого или гематологическими злокачественными опухолями
Белок p53	Типы клеток злокачественных опухолей, экспрессирующие p53	Мужчины и женщины с опухолями, экспрессирующими p53
Белок E7 HPV 16 (ВПЧ)	Злокачественные опухоли шейки матки, вульвы, влагалища, полового члена, ротовой части глотки и ануса.	Инфицированные HPV мужчины и женщины
L2 HPV	Злокачественные опухоли шейки матки, вульвы, влагалища, полового члена, ротовой части глотки и ануса.	Инфицированные HPV мужчины и женщины
PD-L1	Типы злокачественных опухолей, ассоциированные PD-L1	Мужчины и женщины с опухолями, экспрессирующими PD-L1
PD-L1	Типы злокачественных опухолей, ассоциированные PD1	Мужчины и женщины с опухолями, экспрессирующими PD1
CTLA-4	Типы злокачественных опухолей, ассоциированные CTLA-4	Мужчины и женщины с опухолями, экспрессирующими CTLA-4
hCG	Типы клеток злокачественных опухолей, экспрессирующие hCG	Мужчины и женщины с опухолями, экспрессирующими hCG
Fel d1	Аллергия на кошек	Мужчины и женщины, страдающие аллергией на кошек
G-белок (IHNV)	Инфекционный некроз гемопоэтической ткани (IHNV)	Лосось и форель, инфицированные IHNV

Раскрытые антигены также могут быть уместными для применения в других группах пациентов и/или против других специфических или связанных заболеваний. В соответствии с вариантом осуществления можно комбинировать по меньшей мере два, как например, три, четыре и/или пять антигенов.

В соответствии с одним вариантом осуществления белок капсида AP205 является слитым со Spy-Catcher на своем N-конце и/или на своем C-конце, и антиген является слитым со SpyTag и выбранным из группы, состоящей из интерлейкина-17, гемагглютинаина, GD2, EGF-R, CEA, CD52, CD21, белка меланомы человека gp100, белка меланомы человека melan-A/MART1, тирозиназы, NA17-A nt, MAGE-3, E7 HPV 16, L2 HPV, PD1, PD-L1, CTLA-4, p53, hCG, Fel d1 и G-белка (IHNV). В соответствии с одним вариантом осуществления белок капсида AP205 является слитым со SpyCatcher на своем N-конце, и антиген является слитым со SpyTag и выбранным из группы, состоящей из интерлейкина-17, гемагглютинаина, GD2, EGF-R, CEA, CD52, CD21, белка меланомы человека gp100, белка меланомы человека melan-A/MART1, тирозиназы, NA17-A nt, MAGE-3, E7 HPV 16, L2 HPV, PD1, PD-L1, CTLA-4, p53, hCG, Fel d1 и G-белка (IHNV). В соответствии с другим вариантом осуществления белок капсида AP205 является слитым со SpyCatcher на своем C-конце, и антиген является слитым со SpyTag и выбранным из группы,

состоящей из интерлейкина-17, гемагглютинаина, GD2, EGF-R, CEA, CD52, CD21, белка меланомы человека gp100, белка меланомы человека melan-A/MART1, тирозиназы, NA17-A nt, MAGE-3, E7 HPV 16, L2 HPV, PD1, PD-L1, CTLA-4, p53, hCG, Fel d1 и G-белка (IHNV). В соответствии с другим вариантом осуществления белок капсида AP205 является слитым со SpyCatcher на своем N-конце и на своем C-конце, и антиген является слитым со SpyTag и выбранным из группы, состоящей из интерлейкина-17, гемагглютинаина, GD2, EGF-R, CEA, CD52, CD21, белка меланомы человека gp100, белка меланомы человека melan-A/MART1, тирозиназы, NA17-A nt, MAGE-3, E7 HPV 16, L2 HPV, PD1, PD-L1, CTLA-4, p53, hCG, Fel d1 и G-белка (IHNV).

В соответствии с другими вариантами осуществления белок капсида AP205 является слитым со SpyTag на своем N-конце и/или на своем C-конце, и антиген является слитым со SpyCatcher и выбранным из группы, состоящей из интерлейкина-17, гемагглютинаина, GD2, EGF-R, CEA, CD52, CD21, белка меланомы человека gp100, белка меланомы человека melan-A/MART1, тирозиназы, NA17-A nt, MAGE-3, E7 HPV 16, L2 HPV, PD1, PD-L1, CTLA-4, p53, hCG, Fel d1 и G-белка (IHNV). В соответствии с одним вариантом осуществления белок капсида AP205 является слитым со SpyTag на своем N-конце, и антиген является слитым со SpyCatcher и выбранным из группы, состоящей из интерлейкина-17, гемагглютинаина, GD2, EGF-R, CEA, CD52, CD21, белка меланомы человека gp100, белка меланомы человека melan-A/MART1, тирозиназы, NA17-A nt, MAGE-3, E7 HPV 16, L2 HPV, PD1, PD-L1, CTLA-4, p53, hCG, Fel d1 и G-белка (IHNV). В соответствии с другим вариантом осуществления белок капсида AP205 является слитым со SpyTag на своем C-конце, и антиген является слитым со SpyCatcher и выбранным из группы, состоящей из интерлейкина-17, гемагглютинаина, GD2, EGF-R, CEA, CD52, CD21, белка меланомы человека gp100, белка меланомы человека melan-A/MART1, тирозиназы, NA17-A nt, MAGE-3, E7 HPV 16, L2 HPV, PD1, PD-L1, CTLA-4, p53, hCG, Fel d1 и G-белка (IHNV). Белок капсида AP205 является слитым со SpyTag на своем N-конце и на своем C-конце, и антиген является слитым со SpyCatcher и выбранным из группы, состоящей из интерлейкина-17, гемагглютинаина, GD2, EGF-R, CEA, CD52, CD21, белка меланомы человека gp100, белка меланомы человека melan-A/MART1, тирозиназы, NA17-A nt, MAGE-3, E7 HPV 16, L2 HPV, PD1, PD-L1, CTLA-4, p53, hCG, Fel d1 и G-белка (IHNV).

Таблица 2. Неполный перечень заболеваний/медицинских показаний и целевых антигенов/организмов для данной вакцины на основе VLP

<u>Заболевание:</u>	<u>Целевой антиген/ организм:</u>
Злокачественная опухоль:	Her2/Neu (ERBB2) / Homo Sapiens
	Сурвивин (белок 5, содержащий бакуловирусный IAP повтор) / Homo Sapiens
	GD2 / Homo Sapiens.
	EGF-R / Homo Sapiens.
	CEA / Homo Sapiens.
	CD52 / Homo Sapiens.
	Белок меланомы человека gp100 / Homo Sapiens.
	Белок меланомы человека melan-A/MART-1 / Homo Sapiens.
	Тирозиназа / Homo Sapiens.
	Белок NA17-A nt / Homo Sapiens.
	Белок MAGE-3 / Homo Sapiens.

	Белок p53 / Homo Sapiens.
	Белок E7 HPV 16 / вирус папилломы человека
	Белок L2 HPV / вирус папилломы человека
	PD1 / Homo Sapiens
	PD-L1 / Homo Sapiens
	CTLA-4 / Homo Sapiens
	hCG /Homo Sapiens.
	G-белок (IHNV) / вирус инфекционного некроза гемопоэтической ткани
Сердечно-сосудистое заболевание:	PCSK9 (пропротеин конвертаза субтилизин/ кексин типа 9) / Homo Sapiens
Астма / аллергические реакции:	IL-5 (интерлейкин-5) / Homo Sapiens Fel d1
Туберкулез:	Ag85A (диацилглицерол- ацилтрансфераза/миколиттрансфераза) / Mycobacterium tuberculosis
Малярия:	Гомолог 5 ретикулоцит-связывающего белка (PfRH5) / Plasmodium falciparum VAR2CSA (домен, ID1-ID2a) / Plasmodium falciparum Домен CIDR1a PfEMP1, Plasmodium falciparum Богатый глутаматом белок (GLURP) / Plasmodium falciparum Поверхностный белок 3 мерозоита (MSP3) / Plasmodium falciparum 25 кДа поверхностный антиген оокинеты (Pfs25) / Plasmodium falciparum Белок, окружающий спорозонт (CSP) / Plasmodium falciparum Антиген-1 выхода шизонта (PfSEA-1) / Plasmodium falciparum
Рассеянный склероз	CD52 / Homo sapiens
Контрацепция	hCG
Грипп	HA

Вакцину в соответствии с настоящим изобретением также можно применять против других заболеваний и/или можно применять с другими антигенами.

В соответствии с вариантом осуществления настоящего изобретения медицинское показание является выбранным из группы, состоящей из сердечно-сосудистого заболевания, иммуновоспалительного заболевания, хронического заболевания, неврологического заболевания и инфекционного заболевания, а также злокачественной опухоли. В соответствии с конкретным вариантом осуществления медицинское показание представляет собой иммуновоспалительное заболевание. В соответствии с еще одним конкретным вариантом осуществления медицинское показание представляет собой сердечно-сосудистое

заболевание. В соответствии с другим вариантом осуществления медицинское показание представляет собой хроническое заболевание. В соответствии с другим вариантом осуществления медицинское показание представляет собой неврологическое заболевание. В соответствии с другим вариантом осуществления медицинское показание представляет собой сердечно-сосудистое заболевание или иммуновоспалительное заболевание.

В соответствии с другим вариантом осуществления антиген представляет собой полипептид, пептид и/или антигенный фрагмент полипептида, ассоциированные с ненормальной физиологической реакцией, такой как сердечно-сосудистое заболевание и/или аллергическая реакция/заболевание. В соответствии с конкретным вариантом осуществления ненормальная физиологическая реакция представляет собой злокачественную опухоль.

В соответствии с дополнительным вариантом осуществления антиген представляет собой белок, пептид и/или антигенный фрагмент, ассоциированный с медицинским показанием, раскрытым в настоящем изобретении.

Злокачественная опухоль и ассоциированные антигены.

В 2012 году более чем у 14 миллионов взрослых людей была диагностирована злокачественная опухоль, и было зафиксировано более 8 миллионов смертей от злокачественных опухолей в глобальном масштабе. Следовательно, существует потребность в эффективных терапевтических средствах против злокачественных опухолей.

Одной характеристикой клеток злокачественной опухоли являются ненормальные уровни экспрессии генов и белков. Одним примером гена, ассоциированного со злокачественной опухолью, является HER2, который сверхэкспрессируется в 20% всех злокачественных опухолей молочной железы и является ассоциированным с повышенным метастатическим потенциалом и плохой выживаемостью пациентов. Несмотря на то что клетки злокачественных опухолей экспрессируют антигены, ассоциированные со злокачественной опухолью, что тем самым иммунологически отличает их от нормальных клеток, большинство антигенов, ассоциированных со злокачественной опухолью, являются только слабоиммуногенными, поскольку большинство антигенов, ассоциированных со злокачественной опухолью, являются "собственными" белками, к которым хозяин обычно толерантен. Настоящим изобретением данная проблема была решена с помощью эффективной вакцины на основе комплекса антиген-VLP, которая способна активировать иммунную систему для реакции в отношении, например, антигенов, ассоциированных со злокачественной опухолью, и преодоления иммунологической толерантности к таким антигенам. Разные злокачественные опухоли характеризуются тем, что они имеют разные антигены, ассоциированные со злокачественной опухолью. Считается, что сурвивин сверхэкспрессируется в большинстве клеток злокачественных опухолей, и его можно применять в настоящем изобретении. Таким образом, настоящее изобретение можно применять в лечении/профилактике большинства типов злокачественных опухолей, которые сверхэкспрессируют опухолеассоциированный антиген.

Антиген является связанным с белком капсида вируса согласно настоящему изобретению. Например, антиген является связанным с белком капсида AP205 и/или белком капсида фага f1 согласно настоящему изобретению посредством взаимодействия между SpyCatcher и SpyTag (см. фиг. 1 для понимания общей идеи настоящего изобретения). В соответствии с одним вариантом осуществления антиген связан с белком капсида AP205, слитым с одной или несколькими SpyTag посредством взаимодействия между SpyTag и SpyCatcher. В соответствии с одним вариантом осуществления антиген связан с белком капсида AP205, слитым с двумя SpyTag, по одной на каждом конце.

В соответствии с одним вариантом осуществления антиген связан с белком капсида AP205, слитым с одной или несколькими SpyCatcher посредством взаимодействия между SpyTag и SpyCatcher. В соответствии с одним вариантом осуществления антиген связан с белком капсида AP205, слитым с двумя SpyCatcher, по одной на каждом конце.

Таким образом, настоящим изобретением предполагается эффективная вакцина на основе комплекса антиген-VLP, которая способна активировать иммунную систему для реакции в отношении, например, антигенов, ассоциированных со злокачественной опухолью, и преодоления иммунологической толерантности к таким антигенам. В соответствии с вариантом осуществления вакцину на основе VLP согласно настоящему изобретению можно применять для профилактики и/или лечения злокачественной опухоли, с которой ассоциирован антиген.

Вариант осуществления настоящего изобретения предусматривает антиген, ассоциированный со злокачественной опухолью, который связан с белком капсида AP205 и/или белком капсида фага f1 посредством взаимодействия между SpyCatcher и SpyTag. В соответствии с дополнительным вариантом осуществления данную вакцину на основе VLP можно применять для профилактики и/или лечения злокачественной опухоли, с которой ассоциирован антиген.

В соответствии с другим вариантом осуществления настоящее изобретение применяют в лечении/профилактике любого типа злокачественной опухоли, которая сверхэкспрессирует антиген. Тип злокачественной опухоли, в отношении которой можно применять настоящее изобретение, определяется выбором антигена.

Известно, что онковирусы могут вызывать образование злокачественных опухолей. Таким образом,

в соответствии с вариантом осуществления вакцина согласно настоящему изобретению содержит антиген, ассоциированный с онковирусом, который связан с белком капсида AP205 и/или белком капсида фага f1 посредством взаимодействия между SpyCatcher, KTag и/или SpyTag.

В соответствии с дополнительным вариантом осуществления данную вакцину можно применять для профилактики и/или лечения злокачественной опухоли, с которой ассоциирован антиген.

В соответствии с вариантом осуществления антиген представляет собой белок, или пептид, или антигенный фрагмент полипептида, ассоциированный со злокачественной опухолью, выбранной из группы, содержащей злокачественную опухоль надпочечника, злокачественную опухоль анального канала, злокачественную опухоль желчного протока, злокачественную опухоль мочевого пузыря, злокачественную опухоль кости, злокачественные опухоли головного мозга/ЦНС у взрослых, злокачественные опухоли головного мозга/ЦНС у детей, злокачественную опухоль молочной железы, злокачественную опухоль грудной железы у мужчин, злокачественную опухоль у подростков, злокачественную опухоль у детей, злокачественную опухоль у молодых людей, злокачественную опухоль без выявленного первичного очага, болезнь Кастлемана, злокачественную опухоль шейки матки, злокачественную опухоль ободочной/прямой кишки, злокачественную опухоль эндометрия, злокачественную опухоль пищевода, семейство опухолей типа саркомы Юинга, злокачественную опухоль глаза, злокачественную опухоль желчного пузыря, карциноидные опухоли желудочно-кишечного тракта, стромальную опухоль желудочно-кишечного тракта, гестационную трофобластическую болезнь, лимфому Ходжкина, саркому Капоши, злокачественную опухоль почки, злокачественную опухоль гортани и гипотарингеальной области, лейкоз, острый лимфоцитарный лейкоз у взрослых, лейкоз, острый миелоидный лейкоз, хронический лимфоцитарный лейкоз, хронический миелоидный лейкоз, хронический миеломоноцитарный лейкоз, лейкоз у детей, злокачественную опухоль печени, злокачественную опухоль легкого, немелкоклеточную злокачественную опухоль легкого, мелкоклеточную злокачественную опухоль легкого, карциноидную опухоль легкого, лимфому, лимфому кожи, злокачественную мезотелиому, множественную миелому, миелодиспластический синдром, злокачественную опухоль носовой полости и околоносовых пазух, злокачественную опухоль носоглотки, нейробластому, неходжкинскую лимфому, неходжкинскую лимфому у детей, злокачественную опухоль ротовой полости и ротоглоточной области, остеобластическую саркому, злокачественную опухоль яичника, злокачественную опухоль поджелудочной железы, злокачественную опухоль полового члена, опухоли гипофиза, злокачественную опухоль предстательной железы, ретинобластому, рабдомиосаркому, злокачественную опухоль слюнной железы, саркому мягких тканей у взрослых, злокачественную опухоль кожи, базально-клеточную и плоскоклеточную злокачественную опухоль кожи, меланому кожи, злокачественную опухоль кожи из клеток Меркеля, злокачественную опухоль тонкого кишечника, злокачественную опухоль желудка, злокачественную опухоль яичка, злокачественную опухоль тимуса, злокачественную опухоль щитовидной железы, саркому матки, злокачественную опухоль влагалища, злокачественную опухоль вульвы, макроглобулинемию Вальденстрема и опухоль Вильмса.

В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления злокачественная опухоль является выбранной из группы, состоящей из злокачественной опухоли молочной железы, злокачественной опухоли желудка, злокачественной опухоли яичника и серозной карциномы матки.

В результате связывания Her2/Neu (ERBB2) и/или сурвивина или их антигенного фрагмента с VLP образуется вакцина на основе VLP, которая способна активировать иммунную систему для реакции в отношении, например, клеток с высокой экспрессией Her2/Neu (ERBB2) и/или сурвивина и преодоления иммунологической толерантности. В соответствии с вариантом осуществления вакцину на основе VLP с Her2/Neu (ERBB2) и/или сурвивином согласно настоящему изобретению можно применять для профилактики и/или лечения раскрытого в данном документе злокачественного заболевания и/или других злокачественных заболеваний. Используя подобные рассуждения, вакцины на основе VLP с антигеном, ассоциированным с другими злокачественными заболеваниями, можно применять против любого злокачественного заболевания. Такие антигены могут быть выбраны из группы, состоящей из интерлейкина-17, гемагглютинаина, GD2, EGF-R, CEA, CD52, CD21, белка меланомы человека gp100, белка меланомы человека melan-A/MART1, тирозиназы, NA17-A nt, MAGE-3, E7 HPV 16, L2 HPV, PD1, PD-L1, CTLA-4, p53, hCG, Fel d1 и G-белка (IHNV).

В соответствии с вариантом осуществления антиген согласно настоящему изобретению представляет собой Her2/Neu (ERBB2) и/или сурвивин или их антигенный фрагмент, причем антиген является ассоциированным по меньшей мере с одним из раскрытых в данном документе типов злокачественных опухолей и направлен против них. В соответствии с вариантом осуществления антиген согласно настоящему раскрытию представляет собой интерлейкин-17, гемагглютинин, GD2, EGF-R, CEA, CD52, CD21, белок меланомы человека gp100, белок меланомы человека melan-A/MART1, тирозиназу, NA17-A nt, MAGE-3, E7 HPV 16, L2 HPV, PD1, PD-L1, CTLA-4, L2 HPV, PD1, PD-L1, CTLA-4, p53, hCG, Fel d1 и G-белок (IHNV) или их антигенный фрагмент, причем антиген является ассоциированным по меньшей мере с одним из раскрытых в данном документе типов злокачественных опухолей и направлен против них.

В соответствии с вариантом осуществления настоящее изобретение относится к вакцине для применения в профилактике и/или лечении одной из злокачественных опухолей, раскрытых в данном доку-

менте, причем вакцина содержит:

i) белок капсида вируса, такой как белок капсида AP205 и/или белок капсида фага fr, содержащий SpyCatcher, и

ii) антиген, ассоциированный со злокачественной опухолью, такой как Her2/Neu (ERBB2) и/или сурвивин или антигенный фрагмент Her2/Neu (ERBB2) и/или сурвивина, слитый со SpyTag,

причем антиген и белок капсида вируса, такой как белок капсида AP205 и/или белок капсида фага fr, связаны посредством взаимодействия между Spytag и вставкой SpyCatcher в белке капсида AP205 и/или белке капсида фага fr, и при этом i-ii образуют вирусоподобную частицу, экспонирующую указанный антиген.

В соответствии с вариантом осуществления настоящее изобретение относится к вакцине для применения в профилактике и/или лечении одной из злокачественных опухолей, раскрытых в данном документе, причем вакцина содержит:

i) белок капсида вируса, такой как белок капсида AP205 и/или белок капсида фага fr, содержащий SpyTag и/или KTag, и

ii) антиген, ассоциированный со злокачественной опухолью, такой как Her2/Neu (ERBB2) и/или сурвивин или антигенный фрагмент Her2/Neu (ERBB2) и/или сурвивина, слитый со SpyCatcher,

причем антиген и белок капсида вируса, такой как белок капсида AP205 и/или белок капсида фага fr, связаны посредством взаимодействия между SpyCatcher и вставкой Spytag и/или KTag в белке капсида AP205 и/или белке капсида фага fr, и при этом i-ii образуют вирусоподобную частицу, экспонирующую указанный антиген.

В соответствии с другим вариантом осуществления настоящее изобретение относится к вакцине для применения в профилактике и/или лечении одной из злокачественных опухолей, раскрытых в данном документе, причем вакцина содержит:

i) белок капсида вируса, такой как белок капсида AP205 и/или белок капсида фага fr, содержащий SpyTag и/или KTag, и

ii) антиген, ассоциированный со злокачественной опухолью, состоящий из интерлейкина-17, гемагглютинаина, GD2, EGF-R, CEA, CD52, CD21, белка меланомы человека gp100, белка меланомы человека melan-A/MART1, тирозиназы, NA17-A nt, MAGE-3, E7 HPV 16, L2 HPV, PD1, PD-L1, CTLA-4, p53, hCG, Fel d1 и G-белка (IHNV) или их антигенного фрагмента, слитый со SpyCatcher,

причем антиген и белок капсида вируса, такой как белок капсида AP205 и/или белок капсида фага fr, связаны посредством взаимодействия между SpyCatcher и вставкой Spytag и/или KTag в белке капсида AP205 и/или белке капсида фага fr, и при этом i-ii образуют вирусоподобную частицу, экспонирующую указанный антиген.

В соответствии с вариантом осуществления антиген является слитым со SpyCatcher на своих N- или C-концах и выбран из группы, состоящей из интерлейкина-17, гемагглютинаина, GD2, EGF-R, CEA, CD52, CD21, белка меланомы человека gp100, белка меланомы человека melan-A/MART1, тирозиназы, NA17-A nt, MAGE-3, E7 HPV 16, L2 HPV, PD1, PD-L1, CTLA-4, p53, hCG, Fel d1 и G-белка (IHNV) или их антигенного фрагмента.

В соответствии с вариантом осуществления настоящее изобретение относится к вакцине для применения в профилактике и/или лечении одной из злокачественных опухолей, раскрытых в данном документе, причем вакцина содержит:

i) белок капсида вируса, такой как белок капсида AP205 и/или белок капсида фага fr, содержащий SpyCatcher, и

ii) антиген, ассоциированный со злокачественной опухолью, такой как GD2, EGF-R, CEA, CD52, CD21, белок меланомы человека gp100, белок меланомы человека melan-A/MART1, тирозиназа, NA17-A nt, MAGE-3, E7 HPV 16, L2 HPV, PD1, PD-L1, CTLA-4, p53 и hCG или их антигенный фрагмент, слитый со SpyTag,

причем антиген и белок капсида вируса связаны посредством взаимодействия между SpyCatcher и SpyTag, и при этом i-ii образуют вирусоподобную частицу, экспонирующую указанный антиген. В соответствии с дополнительным вариантом осуществления SpyCatcher является слитой с N-концом белка капсида AP205. В соответствии с дополнительным вариантом осуществления SpyCatcher является слитой с N-концом белка капсида AP205 через спейсер. В соответствии с дополнительным вариантом осуществления SpyCatcher является слитой с C-концом белка капсида AP205.

В соответствии с дополнительным вариантом осуществления SpyCatcher является слитой с C-концом белка капсида AP205 через спейсер. В соответствии с дополнительным вариантом осуществления SpyCatcher является слитой с C-концом и с N-концом белка капсида AP205. В соответствии с дополнительным вариантом осуществления SpyCatcher является слитой с C-концом и с N-концом белка капсида AP205 через спейсер.

В соответствии с другим вариантом осуществления настоящее изобретение относится к вакцине для применения в профилактике и/или лечении одной из злокачественных опухолей, раскрытых в данном документе, причем вакцина содержит:

i) белок капсида вируса, такой как белок капсида AP205 и/или белок капсида фага fr, содержащий

одну или несколько SpyTag, и

ii) антиген, ассоциированный со злокачественной опухолью, такой как GD2, EGF-R, CEA, CD52, CD21, белок меланомы человека gp100, белок меланомы человека melan-A/MART1, тирозиназа, NA17-A nt, MAGE-3, E7 HPV 16, L2 HPV, PD1, PD-L1, CTLA-4, p53 и hCG или их антигенный фрагмент, слитый со SpyCatcher,

причем антиген и белок капсида вируса связаны посредством взаимодействия между SpyCatcher и SpyTag, и при этом i-ii образуют вирусоподобную частицу, экспонирующую указанный антиген. В соответствии с дополнительным вариантом осуществления SpyTag является слитой с N-концом белка капсида AP205. В соответствии с дополнительным вариантом осуществления SpyTag является слитой с C-концом белка капсида AP205. В соответствии с другим вариантом осуществления две SpyTag являются слитыми с белком капсида AP205, по одной на каждом конце.

В соответствии с вариантом осуществления антиген, слитый со SpyTag, содержит полипептидную последовательность SEQ ID NO: 79 и/или вариант данной последовательности.

Сердечно-сосудистые заболевания и ассоциированные антигены.

Оценивается, что 17,3 млн людей умерло от сердечно-сосудистых заболеваний в 2008 году, это составляет 30% от числа смертей в мировом масштабе. Внимание к факторам риска, таким как употребление табака, неправильное питание и ожирение, отсутствие физической активности, высокое кровяное давление, диабет и повышенный уровень липидов, является важным для предупреждения сердечно-сосудистых заболеваний. Тем не менее, потребность в превентивных фармацевтических мерах является все более значительной. Настоящее изобретение можно применять в лечении/профилактике большинства типов сердечно-сосудистых заболеваний. Тип сердечно-сосудистого заболевания, в отношении которого можно применять настоящее изобретение, определяется выбором антигена.

В соответствии с вариантом осуществления настоящего изобретения антиген представляет собой белок, или пептид, или антигенный фрагмент полипептида, ассоциированные с заболеванием, выбранным из группы, содержащей нарушение липидного обмена, такое как гиперлипидемия, гиперлипидемия I типа, II типа, III типа, IV типа или V типа, вторичная гипертриглицеридемия, гиперхолестеринемия, семейная гиперхолестеринемия, ксантоматоз, недостаточность холестерина-ацетилтрансферазы, атеросклеротическое состояние (например, атеросклероз), заболевание коронарной артерии, сердечно-сосудистое заболевание.

В соответствии с вариантом осуществления настоящего изобретения антиген представляет собой белок, или пептид, или антигенный фрагмент полипептида, ассоциированные с сердечно-сосудистым заболеванием. В соответствии с дополнительным вариантом осуществления сердечно-сосудистое заболевание выбрано из группы, состоящей из дислипидемии, атеросклероза и гиперхолестеринемии.

Одним примером полипептида, ассоциированного с сердечно-сосудистым заболеванием, является PCSK9, который принимает участие в гомеостазе холестерина. Блокада PCSK9 имеет медицинское значение и может снижать уровни липопротеинов низкой плотности с холестерином (LDL-C) в плазме и/или сыворотке крови. Снижение уровней LDL-C снижает риск, например, сердечных приступов.

При связывании антигена PCSK9 с VLP образуется вакцина на основе комплекса PCSK9-VLP, которая способна активировать иммунную систему для выработки антител, которые связываются с PCSK9 и либо выводят PCSK9 из кровотока, либо затрудняют связывание PCSK9 с LDL рецептором, таким образом снижая уровни LDL-C и риск сердечных приступов. В соответствии с вариантом осуществления вакцину на основе комплекса PCSK9-VLP согласно настоящему изобретению можно применять для профилактики и/или лечения раскрытого в данном документе сердечно-сосудистого заболевания и/или других сердечно-сосудистых заболеваний. Используя подобные рассуждения, вакцины на основе VLP с антигеном, ассоциированным с другими сердечно-сосудистыми заболеваниями, можно применять против любого сердечнососудистого заболевания.

В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления антиген содержит PCSK9 или его антигенный фрагмент, причем антиген является ассоциированным по меньшей мере с одним из раскрытых в данном документе сердечно-сосудистых заболеваний и/или с другими сердечно-сосудистыми заболеваниями и направлен против них.

В соответствии с вариантом осуществления настоящее изобретение относится к вакцине для применения в профилактике и/или лечении по меньшей мере одного из сердечно-сосудистых заболеваний, раскрытых в данном документе, причем вакцина содержит:

i) белок капсида вируса, такой как белок капсида AP205 и/или белок капсида фага fr, содержащий SpyTag и/или KTag, и

ii) антиген, ассоциированный с сердечно-сосудистым заболеванием, такой как PCSK9 или его антигенный фрагмент, слитый со SpyCatcher,

причем антиген и белок капсида вируса, такой как белок капсида AP205 и/или белок капсида фага fr, связаны посредством взаимодействия между SpyCatcher и Spytag и/или KTag в белке капсида вируса, таким как белок капсида AP205 и/или белок капсида фага fr, и при этом i-ii образуют вирусоподобную частицу, экспонирующую указанный антиген.

В соответствии с вариантом осуществления антиген, слитый со SpyCatcher, содержит SEQ ID NO:

20 и/или вариант данной последовательности. В соответствии с вариантом осуществления SpyTag является слитой с N-концом белка капсида AP205, необязательно, через спейсер.

В соответствии с наиболее предпочтительным вариантом осуществления настоящее изобретение относится к вакцине для применения в профилактике и/или лечении по меньшей мере одного из сердечно-сосудистых заболеваний, раскрытых в данном документе, причем вакцина содержит:

i) белок капсида вируса, такой как белок капсида AP205 и/или белок капсида фага fr, содержащий SpyCatcher, и

ii) антиген, ассоциированный с сердечно-сосудистым заболеванием, такой как PCSK9 или его антигенный фрагмент, слитый со SpyTag,

причем антиген и белок капсида вируса, такой как белок капсида AP205 и/или белок капсида фага fr, связаны посредством взаимодействия между SpyCatcher и Spytag, и при этом i-ii образуют вирусоподобную частицу, экспонирующую указанный антиген. В соответствии с дополнительным вариантом осуществления SpyCatcher является слитой с N-концом белка капсида AP205.

В соответствии с вариантом осуществления антиген, слитый со SpyTag, содержит SEQ ID NO: 81 и/или вариант данной последовательности. В соответствии с вариантом осуществления SpyCatcher является слитой с N-концом белка капсида AP205, необязательно, через спейсер. В соответствии с другим вариантом осуществления две SpyCatcher являются слитыми с белком капсида AP205, по одной на каждом конце.

В соответствии с одним вариантом осуществления вакцина для применения в профилактике и/или лечении по меньшей мере одного из раскрытых в данном документе сердечно-сосудистых заболеваний, содержит:

i) белок капсида вируса, такой как белок капсида AP205 и/или белок капсида фага fr, содержащий одну или несколько SpyTag, и

ii) антиген, ассоциированный с сердечно-сосудистым заболеванием, такой как PCSK9 или его антигенный фрагмент, слитый со SpyCatcher,

причем антиген и белок капсида вируса, такой как белок капсида AP205 и/или белок капсида фага fr, связаны посредством взаимодействия между SpyCatcher и Spytag, и при этом i-ii образуют вирусоподобную частицу, экспонирующую указанный антиген. В соответствии с дополнительным вариантом осуществления SpyTag является слитой с N-концом белка капсида AP205, необязательно, через спейсер. В соответствии с другим вариантом осуществления две SpyTag являются слитыми с белком капсида AP205, по одной на каждом конце.

Иммуновоспалительные заболевания и ассоциированные антигены.

Распространенность иммуновоспалительных заболеваний во всем мире резко растет как в развитых, так и в развивающихся странах. Согласно статистике Всемирной организации здравоохранения сотни миллионов субъектов в мире страдают от аллергического ринита, и оценивается, что 300 миллионов имеют астму, значительно воздействующую на качество жизни этих индивидов и оказывающую отрицательное воздействие на socio-экономическое благосостояние общества.

Было показано, что интерлейкин 5 (IL-5) играет определяющую роль в эозинофильном воспалении при различных типах аллергических реакций, в том числе при тяжелой эозинофильной астме. Эозинофилы регулируются IL-5 в отношении их рекрутинга, активации, роста, дифференцировки и выживания, что, следовательно, идентифицировало этот цитокин как первичную мишень для терапевтических вмешательств.

Связывание антигена IL-5 или его фрагмента с VLP согласно настоящему изобретению образует вакцину на основе комплекса IL-5-VLP, которая способна активировать иммунную систему для реакции в отношении IL-5. Следовательно, вакцину на основе комплекса IL-5-VLP, описанную в настоящем изобретении, можно применять в лечении/профилактике эозинофильной астмы или других иммуновоспалительных заболеваний. Другие антигены, ассоциированные с иммуновоспалительным заболеванием (например, IgE или интерлейкин 17 или IL-17), можно применять в настоящем изобретении, используя подобные рассуждения. Следовательно, вакцину на основе комплекса IL-17-VLP, описанную в настоящем изобретении, можно применять в лечении/профилактике эозинофильной астмы или других иммуновоспалительных заболеваний. Тип астмы, или аллергии, или другого иммуновоспалительного заболевания, в отношении которого можно применять настоящее изобретение, определяется выбором антигена. В соответствии с вариантом осуществления антиген представляет собой белок, или пептид, или антигенный фрагмент полипептида, ассоциированный с одним или несколькими из астмы или иммуновоспалительных заболеваний, раскрытых в данном документе. В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления астма или иммуновоспалительное заболевание выбраны из группы, состоящей из эозинофильной астмы, аллергии, полипоза носа, атопического дерматита, эозинофильного эзофагита, гиперэозинофильного синдрома и синдрома Черджа-Стросса.

В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления антиген содержит IL-5, IL-17 или их антигенный фрагмент, причем антиген является ассоциированным по меньшей мере с одним из раскрытых в данном документе астмы или аллергических заболеваний и/или других иммуновоспалительных заболеваний и направлен против них.

В соответствии с вариантом осуществления настоящее изобретение относится к вакцине для применения в профилактике и/или лечении одного из иммуновоспалительных заболеваний, раскрытых в данном документе, причем вакцина содержит:

i) белок капсида вируса, такой как белок капсида AP205 и/или белок капсида фага fr, содержащий SpyTag и/или KTag, и

ii) антиген, такой как IL-5 или IL-17 или их антигенный фрагмент, слитый со SpyCatcher, причем антиген и белок капсида вируса, такой как белок капсида AP205 и/или белок капсида фага fr, связаны посредством взаимодействия между SpyCatcher и сайтом Spytag и/или KTag в белке капсида вируса, и при этом i-ii образуют вирусоподобную частицу, экспонирующую указанный антиген.

В соответствии с вариантом осуществления антиген представляет собой IL-17.

В соответствии с вариантом осуществления антиген, слитый со SpyCatcher, представляет собой IL-5. В соответствии с одним вариантом осуществления антиген содержит SEQ ID NO: 19 и/или вариант данной последовательности.

В соответствии с одним вариантом осуществления белок капсида AP205 является слитым с одной или несколькими SpyTag. В соответствии с одним вариантом осуществления белок капсида AP205 является слитым с двумя SpyTag, по одной на каждом конце белка капсида.

В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления настоящее изобретение относится к вакцине для применения в профилактике и/или лечении одного из раскрытых в данном документе иммуновоспалительных заболеваний, причем вакцина содержит:

i) белок капсида вируса, такой как белок капсида AP205 и/или белок капсида фага fr, содержащий SpyCatcher, и

ii) антиген, такой как IL-5 или IL-17 или их антигенный фрагмент, слитый со SpyTag, причем антиген и белок капсида вируса, такой как белок капсида AP205 и/или белок капсида фага fr, связаны посредством взаимодействия между SpyCatcher и Spytag, и при этом i-ii образуют вирусоподобную частицу, экспонирующую указанный антиген. В соответствии с дополнительным вариантом осуществления SpyCatcher является слитой с N-концом белка капсида AP205. В соответствии с одним вариантом осуществления SpyCatcher является слитой с белком капсида AP205 через спейсер.

В соответствии с вариантом осуществления антиген представляет собой IL-17.

В соответствии с вариантом осуществления антиген, слитый со SpyTag, содержит SEQ ID NO: 80 и/или вариант данной последовательности.

Инфекционные заболевания и ассоциированные антигены.

Туберкулез и малярия представляют собой два основных инфекционных заболевания. Оценивается, что в 2012 году имели место 207 миллионов случаев малярии, которые привели к более чем 500000 смертей. Также оценивается, что в 2012 году у 8,6 миллиона людей развился туберкулез, и 1,3 миллиона умерли от этого заболевания. Современные методы лечения являются недостаточными, и некоторые из них привели в результате к появлению устойчивости к лекарственному средству. Следовательно, существует потребность в новых и эффективных лекарственных средствах для лечения/профилактики туберкулеза и малярии. При связывании антигена, ассоциированного с малярией или туберкулезом, или его фрагмента с VLP согласно настоящему изобретению образуется вакцина на основе VLP, которая способна активировать иммунную систему для реакции, например, в отношении малярии или туберкулеза. Используя подобную цепочку рассуждений, изобретение можно применять в лечении/профилактике большинства инфекционных заболеваний. Тип инфекционного заболевания, в отношении которого можно применять настоящее изобретение, определяется выбором антигена.

В соответствии с вариантом осуществления антиген, слитый со SpyTag или SpyCatcher согласно настоящему изобретению, представляет собой белок, или пептид, или антигенный фрагмент полипептида, ассоциированные с инфекционным заболеванием, таким как туберкулез и/или малярия.

В соответствии с дополнительным вариантом осуществления обеспечивают слияние антигена из *Plasmodium falciparum* со SpyCatcher согласно настоящему изобретению для применения в лечении/профилактике малярии.

В соответствии с дополнительным вариантом осуществления обеспечивают слияние антигена из *Mycobacterium tuberculosis* со SpyCatcher согласно настоящему изобретению для применения в лечении/профилактике туберкулеза.

В соответствии с дополнительным вариантом осуществления антиген выбран из группы, состоящей из Ag85A из *Mycobacterium tuberculosis*, PfrH5 из *Plasmodium falciparum*, VAR2CSA (домен, ID1-ID2a) из *Plasmodium falciparum*, CIDR1a домен PfEMP1 из *Plasmodium falciparum*, GLURP из *Plasmodium falciparum*, MSP3 из *Plasmodium falciparum*, Pfs25 из *Plasmodium falciparum*, CSP из *Plasmodium falciparum* и PfSEA-1 из *Plasmodium falciparum* или антигенного фрагмента раскрытых антигенов. В соответствии с другим вариантом осуществления антиген содержит конструкцию слитого белка между MSP3 и GLURP (GMZ2) из *Plasmodium falciparum*.

В соответствии с дополнительным вариантом осуществления антиген представляет собой антиген гемагглютинирина (HA) из вируса гриппа или его антигенный фрагмент.

В соответствии с другим вариантом осуществления антиген согласно настоящему изобретению со-

держит белок или его антигенный фрагмент из патогенного организма, который вызывает инфекционное заболевание.

В соответствии с одним вариантом осуществления настоящее изобретение относится к вакцине для применения в профилактике и/или лечении одного из инфекционных заболеваний, раскрытых в данном документе, причем вакцина содержит:

i) белок капсида вируса, такой как белок капсида AP205 и/или белок капсида фага fr, содержащий вставку SpyTag, и

ii) антиген, ассоциированный с инфекционным заболеванием, такой как Ag85A из *Mycobacterium tuberculosis*, PfRH5 из *Plasmodium falciparum*, VAR2CSA (домен, ID1-ID2a) из *Plasmodium falciparum*, CIDR1a домен PfEMP1 из *Plasmodium falciparum*, GLURP из *Plasmodium falciparum*, MSP3 из *Plasmodium falciparum*, Pfs25 из *Plasmodium falciparum*, CSP из *Plasmodium falciparum*, PfSEA-1 из *Plasmodium falciparum* и/или HA из вируса гриппа или их антигенный фрагмент, слитый со SpyCatcher,

причем антиген и белок капсида вируса, такой как белок капсида AP205 и/или белок капсида фага fr, связаны посредством взаимодействия между SpyCatcher и Spytag, и при этом i-ii образуют вирусоподобную частицу, экспонирующую указанный антиген. В соответствии с вариантом осуществления антиген, слитый со SpyCatcher, содержит SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28 и/или SEQ ID NO: 82 и/или вариант данных последовательностей. В соответствии с одним вариантом осуществления антиген, слитый со SpyCatcher, содержит SEQ ID NO: 21. В соответствии с одним вариантом осуществления антиген, слитый со SpyCatcher, содержит SEQ ID NO: 24. В соответствии с одним вариантом осуществления антиген, слитый со SpyCatcher, содержит SEQ ID NO: 28. В соответствии с одним вариантом осуществления антиген, слитый со SpyCatcher, содержит SEQ ID NO: 82.

В соответствии с одним вариантом осуществления настоящее изобретение относится к вакцине для применения в профилактике и/или лечении одного из инфекционных заболеваний, раскрытых в данном документе, причем вакцина содержит:

i) белок капсида вируса, такой как белок капсида AP205 и/или белок капсида фага fr, содержащий вставку SpyCatcher, и

ii) антиген, ассоциированный с инфекционным заболеванием, такой как Ag85A из *Mycobacterium tuberculosis*, PfRH5 из *Plasmodium falciparum*, VAR2CSA (домен, ID1-ID2a) из *Plasmodium falciparum*, CIDR1a домен PfEMP1 из *Plasmodium falciparum*, GLURP из *Plasmodium falciparum*, MSP3 из *Plasmodium falciparum*, Pfs25 из *Plasmodium falciparum*, CSP из *Plasmodium falciparum*, PfSEA-1 из *Plasmodium falciparum* и/или HA из вируса гриппа или их антигенный фрагмент, слитый со SpyTag,

причем антиген и белок капсида вируса, такой как белок капсида AP205 и/или белок капсида фага fr, связаны посредством взаимодействия между SpyCatcher и Spytag, и при этом i-ii образуют вирусоподобную частицу, экспонирующую указанный антиген. В соответствии с дополнительным вариантом осуществления SpyCatcher является слитой с N-концом белка капсида AP205.

В соответствии с вариантом осуществления антиген, слитый со Spytag, содержит SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28 и/или SEQ ID NO: 82 и/или вариант данных последовательностей. В соответствии с одним вариантом осуществления антиген, слитый со Spytag, содержит SEQ ID NO: 21. В соответствии с одним вариантом осуществления антиген, слитый со Spytag, содержит SEQ ID NO: 24. В соответствии с одним вариантом осуществления антиген, слитый со Spytag, содержит SEQ ID NO: 28. В соответствии с одним вариантом осуществления антиген, слитый со Spytag, содержит SEQ ID NO: 82.

Индукция иммунного ответа у субъекта.

Активная вакцинация (иммунизация) посредством доставки малых доз антигена субъекту представляет собой путь к активации иммунной системы субъекта для выработки адаптивного иммунитета в отношении антигена. Это позволяет организму субъекта реагировать быстро и эффективно на будущие воздействия.

Аспект настоящего изобретения относится к способу индукции иммунного ответа у субъекта, причем способ предусматривает стадии:

i) получения композиции, содержащей по меньшей мере одну вакцину согласно настоящему изобретению, и/или

ii) введения субъекту указанной композиции по меньшей мере однократно для профилактики и/или лечения заболевания, таким образом индуцируя иммунный ответ у субъекта.

Другой аспект настоящего изобретения относится к способу иммунизации субъекта, нуждающегося в этом, причем указанный способ предусматривает стадии:

i) получения композиции, содержащей по меньшей мере одну вакцину согласно настоящему изобретению, и/или

ii) введения субъекту указанной композиции по меньшей мере однократно для профилактики и/или лечения заболевания, таким образом иммунизируя субъекта, нуждающегося в этом. Другой аспект настоящего изобретения относится к способу получения сильного и длительного иммунного ответа у субъекта, нуждающегося в этом, причем указанный способ предусматривает стадии:

i) получения композиции, содержащей вакцину согласно настоящему изобретению, и/или
 ii) введения вакцины для лечения и/или предупреждения клинического состояния у субъекта, нуждающегося в этом,

причем с помощью вакцины получают сильный и длительный иммунный ответ у субъекта.

В соответствии с вариантом осуществления способ индукции иммунного ответа у субъекта, иммунизации субъекта, нуждающегося в этом, и/или получения сильного и длительного иммунного ответа дополнительно предусматривает по меньшей мере одну бустерную вакцину и/или второй активный ингредиент.

VLP на основе AP205.

Важным элементом данной вакцины на основе VLP является белок капсида AP205, который характеризуется способностью к спонтанной самосборке в вирусоподобные частицы (VLP). Применение VLP на основе AP205 в настоящем изобретении проиллюстрировано на фиг. 1. Неожиданно авторы настоящего изобретения обнаружили, что аминокислотные остатки могут быть слиты с белком капсида AP205 на N- или C-конце белка капсида AP205 без предотвращения сборки VLP, при этом одновременно презентуя добавленные аминокислоты снаружи собранной VLP, где они являются доступными для взаимодействия. В частности, кодирующие остатки SpyTag, SpyCatcher и Ktag могут быть слиты с N- и/или C-концом AP205. Следовательно, целью настоящего изобретения является обеспечение слияния белковой метки с N- и/или C-концом белка капсида AP205. Последовательность белка капсида AP205 раскрыта в SEQ ID NO: 58. Любой вариант белка AP205, который может экспрессироваться с белковой меткой и который все еще способен к самосборке в VLP, при этом презентуя белковую метку на наружной поверхности VLP, является объектом настоящего изобретения.

В соответствии с вариантом осуществления белок капсида AP205 согласно настоящему изобретению содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 58 или биологически активный вариант последовательности, который характеризуется по меньшей мере 85%, или 90%, или 95%, как например, 96%, как например, 97%, как например, 98%, как например, 99%, как например, 99,5%, как например, 100% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 58. Под термином "биологически активный" подразумевается способность к образованию вирусоподобной частицы.

Непосредственное слияние шести различных пептидных последовательностей с N-или C-концом белка капсида AP205 было показано в 2010 году Tissot A.C. и соавт. (Tissot A.C. et al., PLoS ONE, 2010), и оно давало в результате гибридные белки, способные к самосборке в вирусоподобные частицы. Тем не менее, возможность слияния пептидов с N- или C-концом белка оболочки AP205 без предотвращения сборки VLP отнюдь не является бесспорной и в значительной степени зависит от длины и точного аминокислотного состава слитого пептида. Недавно Cielens I. и соавт. (Cielens I. et al., Mol. Biotechnol., 2014) попробовали слить 111 аминокислотную последовательность вирус-нейтрализующего домена III (DIII) гликопротеина E вируса Западного Нила с C-концом белка оболочки AP205. В этом исследовании при рекомбинантной экспрессии слитый белок AP205-DIII не смог собираться в VLP. Более того, также изучали, может ли белок оболочки отдаленно родственного бактериофага f1 переносить вставку пептидных последовательностей в различных аминокислотных положениях вблизи N- и C-конца. Это исследование показывает, что несколько мутантов с N-концевой вставкой в белке оболочки f1 являются неспособными собираться в VLP, а вместо этого образуют димеры (P. Pushko. et al. Protein Eng. 1993). Кроме того, в этом исследовании C-конец белка оболочки f1 мог переносить вставку лишь трех аминокислот, тогда как вставка более длинного пептида предотвращала сборку VLP. Упомянутая вставка пептида находилась, в частности, в положении 2/3 и 128/129 в белке оболочки f1, и, следовательно, на данный момент были описаны только внутренние вставки аминокислот в белок оболочки f1. Авторы настоящего изобретения также наблюдали, что слияние моновалентного стрептавидинового домена (mSA) на N-конце AP205 предотвращало образование VLP; mSA имеет размер, сравнимый с размером SpyCatcher.

В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления белок капсида вируса содержит белок капсида AP205, слитый со SpyCatcher, причем слитый белок белок капсида-SpyCatcher способен к образованию вирусоподобной частицы. В соответствии с дополнительным вариантом осуществления SpyCatcher является слитой с N-концом белка капсида AP205, необязательно, через линкер или спейсер. В соответствии с другим вариантом осуществления SpyCatcher является слитой с C-концом белка капсида AP205, необязательно, через линкер или спейсер. В соответствии с одним вариантом осуществления одна SpyCatcher является слитой с C-концом белка капсида AP205, и одна SpyCatcher является слитой с N-концом белка капсида AP205.

Авторы настоящего изобретения неожиданно показали, что SpyCatcher, содержащая более чем 100 аминокислот, может быть слита с белком капсида, таким как белок капсида AP205 и/или белок капсида фага f1, без нарушения чувствительного процесса самосборки. В соответствии с вариантом осуществления SpyCatcher является слитой с N-концом белка капсида AP205 с помощью короткого гибкого линкера Gly-Gly-Ser-Gly-Ser (SEQ ID NO: 83 или любая другая соответствующая линкерная последовательность). Попытки слияния SpyCatcher с C-концом белка капсида AP205 приводили в результате к отсутствию сборки VLP. В соответствии с другим вариантом осуществления SpyCatcher является слитой с N- и/или C-концом белка капсида фага f1 с помощью короткого гибкого линкера Gly-Gly-Ser-Gly-Ser (SEQ ID NO:

83 или любая другая соответствующая линкерная последовательность).

В соответствии с наиболее предпочтительным вариантом осуществления слитый белок AP205-SpyCatcher содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 76 или биологически активный вариант последовательности, который характеризуется по меньшей мере 70%, как например, 75%, как например, 80%, как например, 85%, как например, 90%, как например, 95%, как например, 96%, как например, 97%, как например, 98%, как например, 99%, как например, 99,5%, как например, 100% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 76 и/или любым из раскрытых в данном документе белков капсида AP205, содержащих полипептид SpyCatcher на N-конце. Под термином "биологически активный" подразумевается способность к образованию вирусоподобной частицы.

Предпочтительный вариант осуществления настоящего изобретения относится к белку капсида AP205, содержащему N-концевую SpyCatcher, который способен образовывать вирусоподобную частицу/самособирается в вирусоподобную частицу. В соответствии с вариантом осуществления SpyCatcher является слитой с N-концом белка капсида AP205, необязательно, через линкер. В соответствии с вариантом осуществления SpyCatcher является слитой с первыми 100 аминокислотами на N-конце AP205. В соответствии с вариантом осуществления SpyCatcher является слитой с AP205 с помощью пептидного линкера, такого как SEQ ID NO: 83. В соответствии с вариантом осуществления белок капсида AP205, содержащий SpyCatcher, имеет полипептидную последовательность, по меньшей мере на 70%, как например, на 75%, как например, на 80%, как например, на 85%, как например, на 90%, как например, на 95%, как например, на 96%, как например, на 97%, как например, на 98%, как например, на 99%, как например, на 99,5%, как например, на 100% идентичную полипептидной последовательности SEQ ID NO: 76. Другой аспект настоящего изобретения относится к белку капсида AP205, содержащему N-концевую SpyCatcher, который может спонтанно образовывать вирусоподобную частицу. В соответствии с вариантом осуществления SpyCatcher является слитой с N-концом белка капсида AP205, необязательно, через линкер. В соответствии с вариантом осуществления SpyCatcher является слитой с первыми 100 аминокислотами на N-конце AP205. В соответствии с вариантом осуществления SpyCatcher является слитой с N-концом AP205 с помощью пептидного линкера, такого как SEQ ID NO: 83. В соответствии с вариантом осуществления белок капсида AP205, содержащий SpyCatcher, имеет полипептидную последовательность, по меньшей мере на 70%, как например, на 75%, как например, на 80%, как например, на 85%, как например, на 90%, как например, на 95%, как например, на 96%, как например, на 97%, как например, на 98%, как например, на 99%, как например, на 99,5%, как например, на 100% идентичную полипептидную последовательности SEQ ID NO: 76.

В соответствии с другим вариантом осуществления белок капсида AP205 является слитым со SpyTag.

VLP на основе фага f1.

Фаг f1, или более точно, белок капсида фага f1, также является важным элементом настоящего изобретения. Белок капсида фага f1 характеризуется способностью к спонтанной самосборке в вирусоподобные частицы. Более того, белок капсида фага f1 является способным к самосборке, даже если аминокислотные остатки слиты с белком капсида фага f1 на N-конце белков капсида f1. Важно, что слитые аминокислоты презентуются на наружной поверхности собранной VLP на основе f1. В частности, кодирующие остатки SpyTag, SpyCatcher и/или Ktag могут быть слиты с N-концом и/или C-концом белка капсида фага f1. Таким образом, целью настоящего изобретения является слияние белковой метки с N-концом белка капсида фага f1. Последовательность белка капсида фага f1 раскрыта в SEQ ID NO: 59 и/или 78. Любой вариант белка капсида фага f1, который все еще может экспрессироваться с белковой меткой и все еще самособирается, является объектом настоящего изобретения.

В соответствии с вариантом осуществления белок капсида фага f1 согласно настоящему изобретению содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 59 и/или 78 или биологически активный вариант последовательности, который характеризуется по меньшей мере 70%, как например, 75%, как например, 80%, как например, 85%, как например, 90%, как например, 95%, как например, 96%, как например, 97%, как например, 98%, как например, 99%, как например, 99,5%, как например, 100% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 59 и/или 78. Под термином "биологически активный" подразумевается способность к образованию вирусоподобной частицы.

Дополнительный аспект настоящего изобретения относится к белку капсида фага f1, содержащему SpyCatcher, который способен образовывать вирусоподобную частицу/самособирается в вирусоподобную частицу. В соответствии с вариантом осуществления SpyCatcher является слитой с любой из первых 50 аминокислот на N-конце и/или с любой из последних 50 - на C-конце белка капсида фага f1. В соответствии с вариантом осуществления SpyCatcher является слитой с белком капсида фага f1 с помощью пептидного линкера, такого как SEQ ID NO: 83. В соответствии с вариантом осуществления белок капсида фага f1, содержащий SpyCatcher, имеет полипептидную последовательность, по меньшей мере на 70%, как например, на 75%, как например, на 80%, как например, на 85%, как например, на 90%, как например, на 95%, как например, на 96%, как например, на 97%, как например, на 98%, как например, на 99%, как например, на 99,5%, как например, на 100% идентичную полипептидную последовательности

SEQ ID NO: 78.

Другой аспект настоящего изобретения относится к белку капсида фага fr, содержащему SpyCatcher, который может спонтанно образовывать вирусоподобную частицу. В соответствии с вариантом осуществления SpyCatcher является слитой с любой из первых 50 аминокислот на N-конце и/или любой из последних 50 - на C-конце белка капсида фага fr. В соответствии с вариантом осуществления SpyCatcher является слитой с белком капсида фага fr с помощью пептидного линкера, такого как SEQ ID NO: 83. В соответствии с вариантом осуществления белок капсида фага fr, содержащий SpyCatcher, имеет полипептидную последовательность, по меньшей мере на 70%, как например, на 75%, как например, на 80%, как например, на 85%, как например, на 90%, как например, на 95%, как например, на 96%, как например, на 97%, как например, на 98%, как например, на 99%, как например, на 99,5%, как например, на 100% идентичную полипептидной последовательности SEQ ID NO: 78.

SpyTag и/или KTag и их положение в AP205 и/или фаге fr.

В соответствии с вариантом осуществления настоящее изобретение относится к вакцине для применения в профилактике и/или лечении заболевания, причем вакцина содержит:

- i) белок капсида AP205, содержащий одну или несколько SpyTag и/или KTag, и
- ii) антиген, слитый со SpyCatcher,

причем антиген и белок капсида AP205 связаны посредством взаимодействия между SpyCatcher и SpyTag и/или KTag, и при этом i-ii образуют вирусоподобную частицу, экспонирующую указанный антиген.

В соответствии с вариантом осуществления полипептид SpyTag и/или KTag является слитым с N- или C-концом белка капсида вируса, такого как белок капсида AP205 и/или белок капсида фага fr. В соответствии с вариантом осуществления две метки, например, две метки SpyTag или две метки SpyCatcher, являются слитыми с белком капсида, таким как белок капсида AP205, по одной на каждом конце. Не вдаваясь в теорию, повышение числа доступных SpyTag или SpyCatcher на поверхности VLP должно максимально повысить способность к связыванию антигена и привести в результате к высокой плотности экспонируемого антигена. Это имеет место в случае слияния двух SpyTag с белком капсида AP205, которое показано ниже в разделе Примеры и на фиг. 13. Специалист в данной области техники может легко определить, улучшает ли слияние двух меток вместо одной связывание антигена.

В соответствии с вариантом осуществления белок капсида AP205, содержащий полипептид SpyTag и/или KTag, содержит аминокислотные последовательности, выбранные из группы, состоящей из SEQ ID NO: (62, 64, 68, 69, 71, 74 и 76), или биологически активный вариант последовательности, который характеризуется по меньшей мере 70%, как например, 75%, как например, 80%, как например, 85%, как например, 90%, как например, 95%, как например, 96%, как например, 97%, как например, 98%, как например, 99%, как например, 99,5%, как например, 100% идентичностью последовательности с любым из раскрытых в данном документе белков капсида AP205, содержащих полипептид SpyTag и/или KTag. Под термином "биологически активный" подразумевается способность к образованию вирусоподобной частицы.

В соответствии с другим вариантом осуществления настоящее изобретение относится к вакцине для применения в профилактике и/или лечении заболевания, причем вакцина содержит:

- i) белок капсида фага fr, содержащий одну или несколько SpyTag и/или KTag, и
- ii) антиген, слитый со SpyCatcher,

причем антиген и белок капсида фага fr связаны посредством взаимодействия между SpyCatcher и сайтом вставки Spytag в белке капсида фага fr, и при этом i-ii образуют вирусоподобную частицу, экспонирующую указанный антиген.

В соответствии с вариантом осуществления белок капсида фага fr, содержащий полипептид SpyTag и/или KTag, содержит аминокислотные последовательности, выбранные из группы, состоящей из SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 70 и SEQ ID NO: 78, или биологически активный вариант последовательности, который характеризуется по меньшей мере 70%, как например, 75%, как например, 80%, как например, 85%, как например, 90%, 95%, как например, 96%, как например, 97%, как например, 98%, как например, 99%, как например, 99,5%, как например, 100% идентичностью последовательности с любой из раскрытых в данном документе белков капсида фага fr, содержащих полипептид SpyTag и/или KTag. Под термином "биологически активный" подразумевается способность к образованию вирусоподобной частицы.

SpyCatcher и ее положение в AP205 и/или фаге fr.

В соответствии с вариантом осуществления полипептид SpyCatcher является слитым с N- или C-концом и/или является слитым с первыми 1-15 аминокислотами (N-концевыми) или последними 1-15 аминокислотами (C-концевыми) белка капсида фага fr, необязательно, с помощью линкера, который описан в данном документе. В соответствии с вариантом осуществления полипептид SpyCatcher является слитым с N-концом и/или является слитым с первыми 1-15 аминокислотами (N-концевыми) белка капсида AP205, необязательно, с помощью линкера, который описан в данном документе. В соответствии с вариантом осуществления SpyCatcher слитая с белком капсида вируса, содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, содержащей SEQ ID NO. 76 и SEQ ID NO. 78, или биологически активный вариант последовательности, который характеризуется по меньшей мере 70%, как например,

75%, как например, 80%, как например, 85%, как например, 90%, как например, 95%, как например, 96%, как например, 97%, как например, 98%, как например, 99%, как например, 99,5%, как например, 100% идентичностью последовательности с последовательностями из группы, содержащей SEQ ID NO. 76 и SEQ ID NO. 78. Под термином "биологически активный" подразумевается способность к образованию вирусоподобной частицы.

В соответствии с вариантом осуществления настоящее изобретение относится к вакцине для применения в профилактике и/или лечении заболевания, причем вакцина содержит:

- i) белок капсида AP205 и/или белок капсида фага fr, содержащие SpyCatcher, и
- ii) антиген, слитый со SpyTag и/или KTag,

причем антиген и белок AP205 связаны посредством взаимодействия между Spytag и/или KTag и SpyCatcher, и при этом i-ii образуют вирусоподобную частицу, экспонирующую указанный антиген. В соответствии с вариантом осуществления SpyCatcher является слитой с N-концом белка капсида AP205, необязательно, через линкер. В соответствии с одним вариантом осуществления SpyCatcher является слитой с N-концом белка капсида AP205 через линкер GSGS (SEQ ID NO: 83).

В соответствии с вариантом осуществления полипептид SpyCatcher является слитым с N-концом белка капсида вируса, такого как белок капсида AP205 или белок капсида фага fr. В соответствии с одним вариантом осуществления SpyCatcher является слитой с N-концом и с C-концом белка капсида вируса, такого как белок капсида AP205.

В соответствии с вариантом осуществления белок капсида AP205, содержащий полипептид SpyCatcher, содержит аминокислотные последовательности, выбранные из группы, состоящей из SEQ ID NO: 76 и/или 78, или биологически активный вариант последовательности, который характеризуется по меньшей мере 70%, как например, 75%, как например, 80%, как например, 85%, как например, 90%, как например, 95%, как например, 96%, как например, 97%, как например, 98%, как например, 99%, как например, 99,5%, как например, 100% идентичностью последовательности с любой из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 76 и/или любым из раскрытых в данном документе белков капсида AP205, содержащих полипептид SpyCatcher на N-конце. Под термином "биологически активный" подразумевается способность к образованию вирусоподобной частицы.

В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления белок капсида вируса содержит белок капсида AP205, слитый со SpyCatcher, причем слитый белок капсида-SpyCatcher способен к образованию вирусоподобной частицы. В соответствии с вариантом осуществления SpyCatcher является слитой с N-концом белка капсида AP205, необязательно, через линкер.

Авторы настоящего изобретения неожиданно показали, что SpyCatcher, содержащая более чем 100 аминокислот, может быть слита с белком капсида, таким как белок капсида AP205 и/или белок капсида фага fr, без нарушения чувствительного процесса самосборки. В соответствии с вариантом осуществления SpyCatcher является слитой с N-концом белка капсида AP205 и/или белка капсида фага fr с помощью короткого гибкого линкера Gly-Gly-Ser-Gly-Ser, такого как SEQ ID NO: 83 или вариант последовательности, который характеризуется по меньшей мере 70%, как например, 75%, как например, 80%, как например, 85%, как например, 90%, как например, 95%, как например, 96%, как например, 97%, как например, 98%, как например, 99%, как например, 99,5%, как например, 100% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 83. Другие пептидные линкеры также можно применять в изобретении.

В соответствии с наиболее предпочтительным вариантом осуществления слитый белок AP205-SpyCatcher содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 76 или биологически активный вариант последовательности, который характеризуется по меньшей мере 70%, как например, 75%, как например, 80%, как например, 85%, как например, 90%, как например, 95%, как например, 96%, как например, 97%, как например, 98%, как например, 99%, как например, 99,5%, как например, 100% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 76 и/или любым из раскрытых в данном документе белков капсида AP205, содержащих полипептид SpyCatcher на N-конце. Под термином "биологически активный" подразумевается способность к образованию вирусоподобной частицы.

В соответствии с другим вариантом осуществления настоящее изобретение относится к вакцине для применения в профилактике и/или лечении заболевания, причем вакцина содержит:

- i) белок капсида фага fr, содержащий SpyCatcher, и
- ii) антиген, слитый со SpyTag и/или KTag,

причем антиген и белок капсида фага fr связаны посредством взаимодействия между Spytag и/или KTag и сайтом вставки SpyCatcher в белке капсида фага fr, и при этом i-ii образуют вирусоподобную частицу, экспонирующую указанный антиген.

В соответствии с вариантом осуществления белок капсида фага fr, содержащий полипептид SpyCatcher, содержит аминокислотные последовательности, выбранные из группы, состоящей из SEQ ID NO: 78, или биологически активный вариант последовательности, который характеризуется по меньшей мере 70%, как например, 75%, как например, 80%, как например, 85%, как например, 90%, 95%, как например, 96%, как например, 97%, как например, 98%, как например, 99%, как например, 99,5%, как например, 100% идентичностью последовательности с любым из раскрытых в данном документе белков

капсида фага fr, содержащих полипептид SpyCatcher. Под термином "биологически активный" подразумевается способность к образованию вирусоподобной частицы.

Антиген, слитый со SpyCatcher, SpyTag и/или KTag.

SpyTag относится к части CnaB2 домена из белка FbaB из *Streptococcus pyogenes*, оптимизированной для связывания со SpyCatcher, состоящей из другой части CnaB2 домена. Взаимодействие происходит, когда непротонированный амин Lys31 атакует углерод карбонила Asp117 по нуклеофильному механизму, причем реакцию катализирует соседний Glu77. Минимальный пептид для опосредования этого связывания представляет собой AHIVMVDA, тогда как C-концевое удлинение, дающее последовательность: AHIVMVDA_{YKPTK}, обеспечивает наиболее оптимальный участок, обозначенный "SpyTag" (Zakeri et al. PNAS 2012).

SpyCatcher представляет собой часть CnaB2 домена из белка FbaB из *Streptococcus pyogenes* и связывается со SpyTag, состоящей из другой части CnaB2 домена. Когда эти два полипептида CnaB2 домена смешивают, они будут спонтанно образовывать необратимую изопептидную связь, таким образом завершая образование CnaB2 домена.

Следовательно, при слиянии антигена со SpyCatcher и смешивании, например, с VLP, содержащей подвергнутую воздействию методов геной инженерии SpyTag, авторы настоящего изобретения получают равномерное презентирование указанных антигенов. Взаимодействие в формате 1:1 между SpyTag и SpyCatcher обеспечивает возможность экспонирования антигена с высокой плотностью, при этом он экспонируется с равномерными интервалами и в соответствующей ориентацией на поверхности VLP, таким образом обеспечивая решение для трех основных критически важных факторов для получения соответствующей активации иммунной системы.

В соответствии с вариантом осуществления антиген, который описан в настоящем изобретении, является слитым со SpyCatcher или ее усеченными вариантами, SpyTag и/или KTag. Примеры антигенов, слитых со Spytag, иллюстрируются SEQ ID NO: 79, 80, 81 и/или 82, но не ограничиваются ими. SpyTag может быть слита с любым из антигенов, раскрытых в данном документе. Кроме того, KTag и/или SpyCatcher можно применять вместо SpyTag, например, без ограничения, в SEQ ID NO: 79, 80, 81 и/или 82.

Неожиданно авторы настоящего изобретения обнаружили, что слитые белки SpyCatcher-антиген согласно настоящему изобретению очень хорошо экспрессируются при условиях экспрессии, описанных в данном документе. Предыдущие попытки экспрессии слитых белков антиген-моновалентный стрептавидин практически исключительно приводили в результате к плохим уровням экспрессии и/или давали в результате нерастворимый белок.

В соответствии с вариантом осуществления SpyCatcher, применяемая в настоящем изобретении, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37.

Усеченные и гомологичные варианты SpyCatcher также являются объектами изобретения, и, следовательно, термином SpyCatcher в данном документе обозначается любой вариант SpyCatcher, который все еще является способным ко взаимодействию со SpyTag и/или KTag. Варианты SpyCatcher могут включать в себя усеченные варианты SpyCatcher, но не ограничиваются ими. Усеченные варианты SpyCatcher могут включать в себя, без ограничения, SEQ NO: 60 и SEQ ID NO: 61. Варианты SpyCatcher, такие как усеченные варианты SpyCatcher, могут проявлять более низкую иммуногенность, чем SpyCatcher дикого типа, не оказывая влияние на способность к связыванию со SpyTag и/или KTag.

В соответствии с вариантом осуществления SpyCatcher, применяемая в настоящем изобретении, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 60.

В соответствии с вариантом осуществления SpyCatcher, применяемая в настоящем изобретении, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61.

В соответствии с другим вариантом осуществления соотношение белок капсида AP205:SpyTag и/или KTag:SpyCatcher/антиген в слитом белке составляет 1:1:1.

В соответствии с другим вариантом осуществления соотношение белок капсида фага fr:SpyTag и/или KTag:SpyCatcher/антиген в слитом белке составляет 1:1:1.

В соответствии с вариантом осуществления антиген, который описан в настоящем изобретении, является слитым со SpyCatcher или ее усеченными вариантами, SpyTag и/или KTag.

Изменение положения, в котором SpyCatcher слита с антигеном (преимущественно на N- или C-конце), позволит изменять ориентацию антигена. Его можно осуществлять для обеспечения возможности наилучшего экспонирования большинства иммуногенных эпитопов антигена. Наилучшая возможная ориентация может отличаться от антигена к антигену.

В соответствии с другим вариантом осуществления антиген, слитый со SpyCatcher, дополнительно содержит или включает в себя дополнительную метку, такую как метка для очистки. Такие метки можно применять для методик очистки, известных специалисту в данной области техники. Метка может быть выбрана из группы, содержащей полигистидиновую метку, кальмодулиновую метку, полиглутаматную метку, E-метку, FLAG-метку, HA-метку, Мус-метку, S-метку, SBP-метку, Softag 1, Softag 3, Strep-метку, Strep-метку II, TC-метку, V5-метку, VSV-метку и Xpress-метку. Другие пептидные или непептидные метки можно применять вместо или в комбинации с вышеупомянутыми пептидными метками. В соответствии с конкретным вариантом осуществления метка представляет собой полигистидиновую метку,

такую как метка из 4xHis, 5xHis, 6xHis, 7xHis, 8xHis, 9xHis или 10xHis.

В соответствии с вариантом осуществления SpyCatcher является слитой с антигеном в любом положении. В соответствии с другим вариантом осуществления SpyCatcher является слитой с антигеном на N-конце, C-конце и/или является слитой с антигеном в кодирующей последовательности антигена. Специалист в данной области техники поймет, как обеспечить слияние антигена и SpyCatcher без встраивания стоп-кодонов, или не вызывая сдвиг рамки считывания или любые другие мутации.

В соответствии с другим вариантом осуществления SpyCatcher, слитая с антигеном, содержит:

i) полипептидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27 и SEQ ID NO: 28, или

ii) вариант последовательности указанной полипептидной последовательности, причем вариант последовательности характеризуется по меньшей мере 70%, как например, 75%, как например, 80%, как например, 85%, как например, 90%, как например, 95%, как например, 96%, как например, 97%, как например, 98%, как например, 99%, как например, 99,5%, как например, 100% идентичностью последовательности с последовательностями из группы, содержащей SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27 и SEQ ID NO: 28.

В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления SpyCatcher, слитая с антигеном, содержит:

i) полипептидную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 19, и/или

ii) вариант последовательности указанной полипептидной последовательности, причем вариант последовательности характеризуется по меньшей мере 70%, как например, 75%, как например, 80%, как например, 85%, как например, 90%, как например, 95%, как например, 96%, как например, 97%, как например, 98%, как например, 99%, как например, 99,5%, как например, 100% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 19.

В соответствии с наиболее предпочтительным вариантом осуществления SpyCatcher, слитая с антигеном, содержит:

i) полипептидную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 18 и/или

ii) вариант последовательности указанной полипептидной последовательности, причем вариант последовательности характеризуется по меньшей мере 70%, как например, 75%, как например, 80%, как например, 85%, как например, 90%, как например, 95%, как например, 96%, как например, 97%, как например, 98%, как например, 99%, как например, 99,5%, как например, 100% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 18.

Лигирование пептидов с помощью SpyLigase.

Систему KTag/SpyTag/SpyLigase также можно применять в настоящем изобретении. CnaB2 домен из *Streptococcus pyogenes* можно применять для создания системы для ковалентного лигирования пептидов (Fierer J.O. et al., 2014). Его выполняют посредством разделения CnaB2 на три части: а) 13 аминокислотная SpyTag (SEQ ID NO: 36), b) β -нить CnaB2 (SEQ ID NO: 38)), называемая KTag, и c) SpyLigase (SEQ ID NO: 55), сконструированная из оставшегося полипептида SpyCatcher. При экспрессии вакцинного антигена с небольшой KTag, слитой на C- или N-конце, и смешивании этого слитого белка с VLP, на которых экспонируется SpyTag, вместе со SpyLigase слитый белок KTag-антиген будет прикрепляться к VLP, содержащей SpyTag, посредством ковалентного лигирования SpyTag с KTag, которому способствует SpyLigase. В противном случае, KTag также может быть введена посредством генетических методов в белок капсида AP205 и/или белок капсида фага fr, в результате чего вакцинный антиген затем должен быть слитым со SpyTag на C- или N-конце. Общий вид системы KTag/SpyTag/SpyLigase проиллюстрирован на фиг. 2. SpyTag также может быть слита с антигеном, и KTag может быть введена в VLP (Fierer J.O. et al., 2014).

Таким образом, аспект настоящего изобретения относится к вакцине для применения в профилактике и/или лечении заболевания, причем вакцина содержит:

i) белок капсида вируса, такой как белок капсида AP205 и/или белок капсида фага fr, содержащий SpyTag, описанную в данном документе, и

ii) антиген, слитый с KTag, описанной в данном документе, и

iii) необязательно, SpyLigase,

причем антиген и белок капсида вируса, такой как белок капсида AP205 и/или белок капсида фага fr, связаны посредством взаимодействия между SpyTag и KTag, и при этом i-ii образуют вирусоподобную частицу, экспонирующую указанный антиген.

В соответствии с еще одним аспектом настоящее изобретение относится к вакцине для применения в профилактике и/или лечении заболевания, причем вакцина содержит:

i) белок капсида вируса, такой как белок капсида AP205 и/или белок капсида фага fr, содержащий KTag, описанную в данном документе, и

ii) антиген, слитый со SpyTag, описанной в данном документе, и

iii) необязательно, SpyLigase,

причем антиген и белок капсида вируса, такой как белок капсида AP205 и/или белок капсида фага fr, связаны посредством взаимодействия между KTag и SpyTag, и при этом i-ii образуют вирусоподобную частицу, экспонирующую указанный антиген.

В соответствии с вариантом осуществления SpyTag и KTag, описанные в данном документе, связаны с помощью SpyLigase, как описано в данном документе.

В аспекте настоящее изобретение относится к вектору, содержащему по меньшей мере один полинуклеотид, кодирующий:

- i) белок капсида вируса, такой как белок капсида AP205 и/или белок капсида фага fr, содержащий SpyTag, которая описана в данном документе, и/или
- ii) антиген, слитый с KTag, которая описана в данном документе, и,
- iii) необязательно, SpyLigase.

Еще один аспект настоящего изобретения относится к вектору, содержащему по меньшей мере один полинуклеотид, кодирующий:

- i) белок капсида вируса, такой как белок капсида AP205 и/или белок капсида фага fr, содержащий KTag, которая описана в данном документе, и/или
- ii) антиген, слитый со SpyTag, которая описана в данном документе, и,
- iii) необязательно, SpyLigase.

Еще один аспект настоящего изобретения относится к клетке-хозяину, причем клетка-хозяин экспрессирует:

- i) первый полипептид; белок капсида вируса, такой как белок капсида AP205 и/или белок капсида фага fr, содержащий SpyTag, которая описана в данном документе, и
 - ii) второй полипептид; антиген, слитый с KTag, которая описана в данном документе, и,
 - iii) необязательно, SpyLigase,
- причем клетка выбрана из группы, содержащей клетки бактерий, дрожжей, грибов, растений, млекопитающих и/или насекомых.

Дополнительный аспект настоящего изобретения относится к клетке-хозяину, причем клетка-хозяин экспрессирует:

- i) первый полипептид; белок капсида вируса, такой как белок капсида AP205 и/или белок капсида фага fr, содержащий KTag, описанную в данном документе, и
 - ii) второй полипептид; антиген, слитый со SpyTag, описанной в данном документе, и,
 - iii) необязательно, SpyLigase,
- причем клетка выбрана из группы, содержащей клетки бактерий, дрожжей, грибов, растений, млекопитающих и/или насекомых.

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к вакцине, и/или вектору, и/или клетке-хозяину, и/или способу получения фармацевтической композиции, которые описаны в настоящем изобретении, причем SpyTag заменена на KTag и/или SpyTag, и/или при этом SpyCatcher заменена на SpyTag и/или KTag.

Система изопептид/С-пилин.

В рамках подобной стратегии для ковалентного связывания вакцинных антигенов на поверхности VLP в настоящем изобретении можно применять еще одну пару партнеров по образованию связи на основе разделенного белка. Основной белок пилин, Spy0128, из *Streptococcus pyogenes* можно разделить на два фрагмента (split-Spy0128 (остатки 18-299 в Spy0128) (SEQ ID NO: 57) и изопептид (остатки 293-308 в Spy0128 (TDKDMTITFTNKKDAE))) (SEQ ID NO: 56), которые вместе способны к образованию межмолекулярного ковалентного комплекса (Zakeri B. et al., 2010). Наряду с описанной стратегией на основе взаимодействия SpyTag-SpyCatcher, изопептид Spy0128 вводят с помощью генетических методов в обращенную к поверхности петлю VLP, и он обеспечивает возможность стабильного прикрепления вакцинных антигенов, слитых на N- или С-конце, с партнером по образованию связи split-Spy0128.

Таким образом, в соответствии с дополнительным аспектом настоящее изобретение относится к вакцине для применения в профилактике и/или лечении заболевания, причем вакцина содержит:

- i) белок капсида вируса, такой как белок капсида AP205 и/или белок капсида фага fr, содержащий вставку изопептида Spy0128, описанную в данном документе, и
 - ii) антиген, слитый со split-Spy0128, описанным в данном документе,
- причем антиген и белок капсида вируса, такой как белок капсида AP205 и/или белок капсида фага fr, связаны посредством взаимодействия между изопептидом Spy0128 и split-Spy0128, и при этом i-ii образуют вирусоподобную частицу, экспонирующую указанный антиген.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к вектору, содержащему по меньшей мере один полинуклеотид, кодирующий а) белок капсида вируса, такой как белок капсида AP205 и/или белок капсида фага fr, содержащие вставку изопептида Spy0128, и б) антиген, слитый со split-Spy0128.

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к вакцине, и/или вектору, и/или клетке-хозяину, и/или способу получения фармацевтической композиции, которые описаны в настоящем изобретении, причем SpyTag заменена на изопептид Spy0128, и при этом SpyCatcher заменена на split-Spy0128, как описано в данном документе.

Вектор и полинуклеотидные/полипептидные последовательности.

В молекулярном клонировании вектор представляет собой молекулу ДНК, применяемую в качестве носителя для того, чтобы искусственным образом переносить чужеродный генетический материал в клетку, где он может реплицироваться и/или экспрессироваться. Четыре главных типа векторов представляют собой плазмиды, вирусные векторы, космиды и искусственные хромосомы. Сам вектор обычно представляет собой последовательность ДНК, которая состоит из вставки (трансгена) и последовательности большей длины, которая служит в качестве "остова" вектора. Целью вектора, который переносит генетическую информацию в другую клетку, как правило, является выделение, увеличение количества или экспрессия вставки в клетке-мишени. Векторы экспрессии (экспрессионные конструкции), в частности, предназначены для экспрессии трансгенов в клетках-хозяевах и обычно имеют промоторную последовательность, которая управляет экспрессией трансгена.

Гетерологичная экспрессия/продукция вакцины согласно настоящему изобретению содержит два пептидных компонента: 1) белок капсида вируса, такой как белок капсида AP205 и/или белок капсида фага fr, содержащий одну или две SpyTag или SpyCatcher, и 2) антиген, слитый с другой из SpyCatcher и SpyTag. Таким образом, в соответствии с вариантом осуществления настоящего изобретения каждый из пептидных компонентов кодируется полинуклеотидной последовательностью, и каждая из полинуклеотидных последовательностей может экспрессироваться на одной или двух разных плаزمидях.

Для обеспечения возможности гетерологичной экспрессии/продукции вакцины одним аспектом изобретения является вектор, содержащий по меньшей мере один полинуклеотид, кодирующий:

i) белок капсида вируса, такой как белок капсида AP205 и/или белок капсида фага fr, содержащий SpyTag, и/или

ii) антиген, слитый со SpyCatcher.

В соответствии с одним вариантом осуществления вакцина представляет собой вектор, содержащий по меньшей мере один полинуклеотид, кодирующий:

i) белок капсида вируса, такой как белок капсида AP205 и/или белок капсида фага fr, содержащие SpyCatcher, и/или

ii) антиген, слитый со SpyTag.

В соответствии с другим вариантом осуществления вектор содержит по меньшей мере два полинуклеотида для следующих полипептидов:

i) белок капсида вируса, такой как белок капсида AP205 и/или белок капсида фага fr, содержащий одну или несколько SpyTag, и/или ii. антиген, слитый со SpyCatcher.

В соответствии с другим вариантом осуществления вектор содержит по меньшей мере два полинуклеотида для следующих полипептидов:

i) белок капсида вируса, такой как белок капсида AP205 и/или белок капсида фага fr, содержащий одну или несколько SpyCatcher, и/или ii. антиген, слитый со SpyTag.

В соответствии с одним вариантом осуществления вектор содержит последовательности, кодирующие по меньшей мере:

i) белок капсида вируса, такой как белок капсида AP205, слитый с двумя SpyTag, причем одна из двух SpyTag является слитой с С-концом белка капсида, а другая из двух SpyTag является слитой с N-концом белка капсида,

ii) антиген, слитый со SpyCatcher.

В соответствии с одним вариантом осуществления вектор содержит последовательности, кодирующие по меньшей мере:

i) белок капсида вируса, такой как белок капсида AP205, слитый с двумя SpyCatcher, причем одна из двух SpyCatcher является слитой с С-концом белка капсида, а другая из двух SpyCatcher является слитой с N-концом белка капсида,

ii) антиген, слитый со SpyTag.

В соответствии с дополнительным вариантом осуществления антиген, слитый со SpyCatcher, имеет полинуклеотидную последовательность, содержащую:

i) полинуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID 29, SEQ ID 30, SEQ ID 31, SEQ ID 32, SEQ ID 33, SEQ ID 34, SEQ ID 35, и/или

ii) вариант последовательности указанной полинуклеотидной последовательности, причем вариант последовательности характеризуется по меньшей мере 70%, как например, 75%, как например, 80%, как например, 85%, как например, 90%, как например, 95%, как например, 96%, как например, 97%, как например, 98%, как например, 99%, как например, 99,5%, как например, 100% идентичностью последовательности с указанными SEQ ID 11, SEQ ID 12, SEQ ID 13, SEQ ID 14, SEQ ID 15, SEQ ID 16, SEQ ID 17, и/или

iii) вариант последовательности указанного полинуклеотида, для которого изменено предпочтение кодонов.

В соответствии с вариантом осуществления полипептид SpyTag содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 39.

В соответствии с вариантом осуществления настоящее изобретение относится к вектору, содержа-

щему по меньшей мере один полинуклеотид, кодирующий

- i) белок капсида AP205, содержащий SpyCatcher, и/или
- ii) антиген, слитый со SpyTag и/или KTag.

В соответствии с дополнительным вариантом осуществления SpyCatcher является слитой с N-концом белка капсида AP205, необязательно, через линкер.

В соответствии с вариантом осуществления белок капсида AP205, содержащий SpyCatcher, содержит полинуклеотидную последовательность, кодирующую полипептидную последовательность Seq ID No: 76 или биологически активный вариант последовательности, который характеризуется по меньшей мере 70%, как например, 75%, как например, 80%, как например, 85%, как например, 90%, как например, 95%, как например, 96%, как например, 97%, как например, 98%, как например, 99%, как например, 99,5%, как например, 100% идентичностью последовательности с полипептидной последовательностью Seq ID No: 76 и/или любым из раскрытых в данном документе белков капсида AP205, содержащих полипептид SpyCatcher на N-конце. Под термином "биологически активный" подразумевается способность к образованию вирусоподобной частицы.

В соответствии с вариантом осуществления белок капсида фага fr, содержащий SpyCatcher, содержит полинуклеотидную последовательность, кодирующую полипептидную последовательность Seq ID No: 78 или биологически активный вариант последовательности, который характеризуется по меньшей мере 70%, как например, 75%, как например, 80%, как например, 85%, как например, 90%, как например, 95%, как например, 96%, как например, 97%, как например, 98%, как например, 99%, как например, 99,5%, как например, 100% идентичностью последовательности с любым из раскрытых в данном документе белков капсида фага fr, содержащих полипептид SpyCatcher. Под термином "биологически активный" подразумевается способность к образованию вирусоподобной частицы.

Клетка-хозяин.

Настоящее изобретение дополнительно относится к клетке-хозяину, содержащей полинуклеотид и/или вектор. Полинуклеотид может иметь последовательность, которая оптимизирована с точки зрения использования кодонов. Методы оптимизации кодонов являются известными в уровне техники и обеспечивают возможность оптимизированной экспрессии в гетерологичном организме- или клетке-хозяине. В соответствии с вариантом осуществления клетка-хозяин может быть выбрана из группы, содержащей клетки бактерий, дрожжей, грибов, растений, млекопитающих и/или насекомых.

Методы экспрессии первого полипептида, белка капсида вируса, такого как белок капсида AP205 и/или белок капсида фага fr, содержащего SpyTag, и/или второго полипептида, антигена, слитого со SpyCatcher, в клетке-хозяине являются известными в уровне техники. Первый или второй полипептид могут гетерологично экспрессироваться с соответствующих полинуклеотидных последовательностей, клонированных в геном клетки-хозяина, или они могут содержаться в векторе. Например, первый и/или второй полинуклеотид, кодирующие первый и/или второй полипептид, клонируют в геном, и первый и/или второй полинуклеотид, кодирующие первый и/или второй полипептид, содержатся в векторе, трансформируемом или трансфицируемом в клетку-хозяина. В качестве альтернативы, первый и/или второй полинуклеотид содержатся в первом векторе, и первый и/или второй полинуклеотид содержатся во втором векторе, и первый и/или второй содержатся в третьем векторе.

Экспрессия первого и второго полипептидов в клетке-хозяине может происходить на временной основе. Если полинуклеотид, кодирующий один из полипептидов, клонируют в геном, индуцируемый промотор также можно клонировать для управления экспрессией полипептидов. Такие индуцируемые промоторы являются известными в уровне техники. В качестве альтернативы, гены, кодирующие супрессоры сайленсинга гена, также можно клонировать в геном или в вектор, трансфицируемый в клетку-хозяина.

В соответствии с конкретным вариантом осуществления клетка-хозяин может быть выбрана из группы, содержащей *Escherichia coli*, *Spodoptera frugiperda* (sf9), *Trichoplusia ni* (BTI-TN-5B1-4), *Pichia Pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha*, *Drosophila Schneider* 2 (S2), *Lactococcus lactis*, клетки яичника китайского хомячка (CHO), клетки эмбриональной почки человека 293, *Nicotiana tabacum* cv. Samsun NN и *Solanum tuberosum* cv. Solara. Таким образом, в соответствии с вариантом осуществления клетка-хозяин представляет собой *Escherichia coli*. В соответствии с другим вариантом осуществления клетка-хозяин представляет собой *Spodoptera frugiperda*. В соответствии с другим вариантом осуществления клетка-хозяин представляет собой *Pichia Pastoris*. В соответствии с другим вариантом осуществления клетка-хозяин представляет собой *Saccharomyces cerevisiae*. В соответствии с другим вариантом осуществления клетка-хозяин представляет собой *Hansenula polymorpha*. В соответствии с другим вариантом осуществления клетка-хозяин представляет собой *Drosophila Schneider* 2. В соответствии с другим вариантом осуществления клетка-хозяин представляет собой *Lactococcus lactis*. В соответствии с другим вариантом осуществления клетка-хозяин представляет собой клетку яичника китайского хомячка (CHO). В соответствии с другим вариантом осуществления клетка-хозяин представляет собой клетку эмбриональной почки человека 293. В соответствии с другим вариантом осуществления клетка-хозяин представляет собой *Trichoplusia ni* (BTI-TN-5B1-4). В соответствии с другим вариантом осуществления клетка-хозяин представляет собой *Nicotiana tabacum* cv. Samsun NN. В соответствии с другим вариантом

осуществления клетка-хозяин представляет собой *Solanum tuberosum* cv. Solara.

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к клетке-хозяину, экспрессирующей по меньшей мере один полипептид, кодируемый любым из полинуклеотидов, раскрытых в изобретении.

В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления предусматривается экспрессия белка капсида AP205 и/или белка капсида фага fr, содержащих SpyCatcher, причем слитый белок белок капсида-SpyCatcher способен к образованию вирусоподобной частицы. В соответствии с дополнительным вариантом осуществления SpyCatcher слита с N-концом белка капсида AP205, необязательно, через линкер.

Авторы настоящего изобретения неожиданно показали, что SpyCatcher, содержащая более чем 100 аминокислот, может быть слита с белком капсида, как например, с N-концом белка капсида AP205 и/или белка капсида фага fr, без нарушения чувствительного процесса самосборки.

В соответствии с вариантом осуществления клетка-хозяин экспрессирует:

i) первый полипептид; белок капсида вируса, такой как белок капсида AP205 и/или белок капсида фага fr, содержащий SpyCatcher, и/или

ii) второй полипептид; антиген, слитый со SpyTag,

причем клетка выбрана из группы, содержащей клетки бактерий, дрожжей, грибов, растений, млекопитающих и/или насекомых.

В соответствии с наиболее предпочтительным вариантом осуществления клетка-хозяин экспрессирует белок капсида AP205, содержащий SpyCatcher, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 76 или биологически активный вариант последовательности, который характеризуется по меньшей мере 70%, как например, 75%, как например, 80%, как например, 85%, как например, 90%, как например, 95%, как например, 96%, как например, 97%, как например, 98%, как например, 99%, как например, 99,5%, как например, 100% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 76 и/или любым из раскрытых в данном документе белков капсида AP205, содержащих полипептид SpyCatcher на N-конце. Под термином "биологически активный" подразумевается способность к образованию вирусоподобной частицы.

В соответствии с вариантом осуществления клетка-хозяин экспрессирует:

i) первый полипептид; белок капсида вируса, такой как белок капсида AP205 и/или белок капсида фага fr, содержащий SpyTag, и/или

ii) второй полипептид; антиген, слитый со SpyCatcher,

причем клетка выбрана из группы, содержащей клетки бактерий, дрожжей, грибов, растений, млекопитающих и/или насекомых.

В соответствии с дополнительным вариантом осуществления клетка-хозяин экспрессирует:

i) первый полипептид, имеющий последовательность, по меньшей мере на 70%, как например, на 75%, как например, на 80%, как например, на 85%, как например, на 90%, как например, на 95%, как например, на 96%, как например, на 97%, как например, на 98%, как например, на 99%, как например, на 99,5%, как например, на 100% идентичную SEQ ID NO: 62 [Spy-AP205]; SEQ ID NO: 64 [AP205-Spy], SEQ ID NO: 66 [Spy-фaг fr], SEQ ID NO: 68 [Ktag-AP205], SEQ ID NO: 69 [AP205-Ktag], SEQ ID NO: 70 [Ktag-фaг fr], SEQ ID NO: 71 [Spy-AP205-Spy], SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 78,

ii) второй полипептид, имеющий последовательность, по меньшей мере на 70%, как например, на 75%, как например, на 80%, как например, на 85%, как например, на 90%, как например, на 95%, как например, на 96%, как например, на 97%, как например, на 98%, как например, на 99%, как например, на 99,5%, как например, на 100% идентичную SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 80 и SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27 и SEQ ID NO: 28, причем клетка выбрана из группы, содержащей клетки бактерий, дрожжей, грибов, растений, млекопитающих и/или насекомых.

В соответствии с другим вариантом осуществления клетка-хозяин экспрессирует:

i) первый полипептид; белок капсида фага fr, содержащий SpyTag, такой как полипептид, имеющий последовательность, по меньшей мере на 70%, как например, на 75%, как например, на 80%, как например, на 85%, как например, на 90%, как например, на 95%, как например, на 96%, как например, на 97%, как например, на 98%, как например, на 99%, как например, на 99,5%, как например, на 100% идентичную SEQ ID NO: 66, и/или

ii) второй полипептид; антиген, слитый со SpyCatcher, такой как полипептид, имеющий последовательность, по меньшей мере на 70%, как например, на 75%, как например, на 80%, как например, на 85%, как например, на 90%, как например, на 95%, как например, на 96%, как например, на 97%, как например, на 98%, как например, на 99%, как например, на 99,5%, как например, на 100% идентичную SEQ ID NO: 18, причем клетка выбрана из группы, содержащей клетки бактерий, дрожжей, грибов, растений, млекопитающих и/или насекомых.

В соответствии с другим вариантом осуществления клетка-хозяин экспрессирует:

i) первый полипептид; белок капсида AP205, содержащий две SpyTag, такой как полипептид, имеющий последовательность, по меньшей мере на 70%, как например, на 75%, как например, на 80%, как например, на 85%, как например, на 90%, как например, на 95%, как например, на 96%, как например, на 97%, как например, на 98%, как например, на 99%, как например, на 99,5%, как например, на 100% иден-

ii) второй полипептид; антиген, слитый со SpyTag, такой как полипептид, имеющий последовательность, по меньшей мере на 70%, как например, на 75%, как например, на 80%, как например, на 85%, как например, на 90%, как например, на 95%, как например, на 96%, как например, на 97%, как например, на 98%, как например, на 99%, как например, на 99,5%, как например, на 100% идентичную SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 81 и/или SEQ ID NO: 82, причем клетка выбрана из группы, содержащей клетки бактерий, дрожжей, грибов, растений, млекопитающих и/или насекомых.

Авторы настоящего изобретения продемонстрировали образование VLP на основе AP205 с применением клеток *E.coli*, как например, BL21 клеток, инкубируемых при 16°C в течение 18 ч. Другие условия и хозяева экспрессии могут давать на выходе VLP.

В соответствии с конкретным вариантом осуществления клетки *Trichoplusia ni* применяют в качестве клетки-хозяина для экспрессии любого из раскрытых полинуклеотидов и/или полипептидов. В соответствии с другим вариантом осуществления клетки *Trichoplusia ni* применяют для экспрессии полипептида, имеющего последовательность, по меньшей мере на 70%, как например, на 75%, как например, на 80%, как например, на 85%, как например, на 90%, как например, на 95%, как например, на 96%, как например, на 97%, как например, на 98%, как например, на 99%, как например, на 99,5%, как например, на 100% идентичную любому из полипептидов, раскрытых в данном документе.

Композиция, содержащая вакцину.

Вакцину согласно настоящему изобретению следует применять в профилактике и/или лечении заболевания. Таким образом, один аспект настоящего изобретения относится к композиции, содержащей вакцину согласно настоящему изобретению. Такие композиции могут дополнительно содержать, например, адъювант, буфер и/или соли или их комбинацию.

Адъювант представляет собой фармакологическое и/или иммунологическое средство, которое модифицирует воздействие других средств. Адъюванты можно добавлять к вакцине для модификации иммунного ответа, усиливая его, как например, с получением большего количества антител и/или более длительной защиты, тем самым сводя к минимуму количество вводимого инъекцией чужеродного материала. Адъюванты также можно применять для повышения эффективности вакцины, помогая нарушать иммунный ответ в конкретных типах клеток иммунной системы, например, активируя Т-клетки вместо антителосекретирующих В-клеток, зависящих от типа вакцины.

Таким образом, в соответствии с вариантом осуществления композиция содержит по меньшей мере один адъювант. В соответствии с вариантом осуществления адъювант имеет в основе алюминий. Алюминиевые адъюванты могут представлять собой фосфат алюминия, гидроксид алюминия, аморфный гидроксифосфат-сульфат алюминия и/или их комбинацию. Также могут быть включены другие адъюванты.

В соответствии с другим вариантом осуществления композиция, описанная выше, содержит по меньшей мере один буфер. В соответствии с вариантом осуществления буфер имеет в основе PBS и/или гистидин. В соответствии с другим вариантом осуществления буфер имеет pH от pH 6 до pH 7,5. В соответствии с вариантом осуществления буфер является изотоничным, как например, имеет от 0,6 до 1,8% NaCl.

Эмульгатор (также известный как "эмульгирующее вещество") представляет собой вещество, которое стабилизирует эмульсию посредством повышения ее кинетической стабильности. Один класс эмульгаторов известен как "поверхностно-активные средства" или поверхностно-активные вещества. Полисорбаты представляют собой класс эмульгаторов, применяемых в некоторых фармацевтических средствах и приготовлении пищи. Общеизвестные торговые названия для полисорбатов включают в себя Alkest, Canarcel и Tween. Некоторые примеры полисорбатов представляют собой полисорбат 20, полисорбат 40, полисорбат 60, полисорбат 80. В соответствии с вариантом осуществления композиция согласно изобретению содержит эмульгатор, как например, один из вышеописанных полисорбатов. В соответствии с конкретным вариантом осуществления композиция содержит 0,001-0,02% полисорбата 80. Другие полисорбаты или эмульгаторы также могут быть применены в настоящем изобретении.

Фармацевтическая композиция, содержащая вакцину.

Вакцина согласно настоящему изобретению предназначена для применения в профилактике и/или лечении заболевания. Соответственно, настоящим изобретением дополнительно предполагается фармацевтический состав, который содержит вакцину согласно настоящему изобретению и фармацевтически приемлемый носитель для нее. Фармацевтические составы можно получить с помощью традиционных методик, например, которые описаны в Remington: The Science and Practice of Pharmacy 2005, Lippincott, Williams & Wilkins.

Фармацевтически приемлемые носители могут быть либо твердыми, либо жидкими. Препараты в твердой форме включают в себя порошки, таблетки, пилюли, капсулы, крахмальные облатки, суппозитории и диспергируемые гранулы. Твердый носитель может представлять собой одно или несколько вспомогательных веществ, которые также могут действовать в качестве разбавителей, ароматизаторов, солиubilизаторов, смазывающих средств, суспендирующих средств, связующих средств, консервантов, смазывающих средств, средств для улучшения распадаемости таблеток или инкапсулирующего материала.

Также включены препараты в твердой форме, которые предназначены для превращения в препара-

ты в жидкой форме для перорального введения непосредственно перед применением. Такие жидкие формы включают в себя растворы, суспензии и эмульсии. Эти препараты могут содержать, в дополнение к активному компоненту, красители, ароматизаторы, стабилизаторы, буферы, искусственные и натуральные подсластители, диспергаторы, загустители, солюбилизующие средства и т.п.

Соединения согласно настоящему изобретению могут быть составлены для парентерального введения и могут присутствовать в единичной лекарственной форме в ампулах, предварительно заполненных шприцах, небольшом объеме раствора для инфузии или в контейнерах с несколькими дозами, необязательно, с добавленным консервантом. Композиции могут принимать такие формы, как суспензии, растворы или эмульсии в масляных или водных средах, например растворы в водном полиэтиленгликоле. Примеры масляных или неводных носителей, разбавителей, растворителей или сред включают в себя пропиленгликоль, полиэтиленгликоль, растительные масла и инъекционные сложные эфиры органических кислот, и они могут содержать средства, такие как консерванты, смачивающие, эмульгирующие или суспендирующие, стабилизирующие и/или диспергирующие средства. Предпочтительно, состав будет содержать приблизительно от 0,5 до 75 вес.% активного ингредиента (активных ингредиентов), причем остальная часть состоит из подходящих фармацевтических вспомогательных веществ, которые описаны в данном документе.

Вакцину согласно настоящему изобретению можно вводить параллельно, одновременно или совместно с фармацевтически приемлемым носителем или разбавителем, особенно и предпочтительно в форме ее фармацевтической композиции, посредством любого из перорального, ректального или парентерального (в том числе подкожного) пути, в эффективном количестве.

Таким образом, один аспект настоящего изобретения относится к фармацевтической композиции, содержащей вакцину. Такая фармацевтическая композиция может содержать адъювант, буфер и/или соли или их комбинацию.

В соответствии с вариантом осуществления фармацевтическая композиция дополнительно содержит композицию, содержащую вакцину, которая описана в настоящем изобретении.

Способ получения фармацевтической композиции, содержащей вакцину Настоящее изобретение дополнительно относится к способу получения фармацевтической композиции, содержащей вакцину. В одном аспекте вакцину на основе VLP согласно настоящему изобретению можно получать по меньшей мере с помощью следующих стадий:

- i) получение первого полипептида, содержащего: белок капсида вируса, такой как белок капсида AP205 и/или белок капсида фага fr, содержащий SpyTag, и/или
- ii) получение второго полипептида; антигена, слитого со SpyCatcher, и
- iii) воздействие на первый полипептид условиями, которые обеспечивают возможность образования вирусоподобных частиц, и/или
- iv) получение вакцины с помощью связывания второго полипептида и указанных вирусоподобных частиц посредством взаимодействия между SpyCatcher и SpyTag в указанных вирусоподобных частицах, и/или
- v) образование композиции, содержащей указанную вакцину, получая таким образом фармацевтическую композицию.

В одном аспекте вакцину на основе VLP согласно настоящему изобретению можно получать, по меньшей мере, с помощью следующих стадий:

- i) получение первого полипептида, содержащего: белок капсида вируса, такой как белок капсида AP205 и/или белок капсида фага fr, содержащий SpyCatcher, и/или
- ii) получение второго полипептида: антигена, слитого со SpyTag, и
- iii) воздействие на первый полипептид условиями, которые обеспечивают возможность образования вирусоподобных частиц, и/или
- iv) получение вакцины с помощью связывания второго полипептида и указанных вирусоподобных частиц посредством взаимодействия между SpyCatcher и SpyTag в указанных вирусоподобных частицах, и/или
- v) образование композиции, содержащей указанную вакцину, получая таким образом фармацевтическую композицию.

В получение фармацевтической композиции могут быть включены другие стадии, например: а) выделение/очистка VLP с получением на выходе продукта высокой чистоты/высокого качества. Это будет достигаться с применением различных методик для очистки белка. С этой целью несколько стадий разделения будут осуществляться на основании различий, например в размере, физико-химических свойствах, аффинности связывания или биологической активности белка; б) получение состава посредством добавления стабилизаторов для продления периода хранения или консервантов для обеспечения возможности безопасного применения пузырьков с несколькими дозами; с) все компоненты, которые составляют окончательную вакцину, объединяют и смешивают до однородного состояния, например, в одном пузырьке или шприце; d) вакцину помещают в сосуд-приемник (например, пузырек или шприц) и запечатывают стерильными пробками.

Все процессы, описанные выше, должны соответствовать стандартам, определенным для Надлежа-

щей практики организации производства (Good Manufacturing Practices) (GMP), которая будет включать несколько процедур контроля качества и отвечающую требованиям инфраструктуру, а также разделение операций во избежание перекрестного загрязнения. Наконец, вакцину можно снабдить этикеткой и распространять по всему миру.

Способ введения вакцины.

Пути введения.

Системное лечение. Основными путями введения являются пероральный и парентеральный с целью введения средства в кровоток, чтобы, в конечном итоге, целенаправленно воздействовать на места приложения действия. Соответствующие лекарственные формы для такого введения могут быть получены с помощью традиционных методов.

Пероральное введение. Пероральное введение является нормальным для доставки лекарственного средства в кишечник, причем средство доставляется через слизистую кишечника.

Парентеральное введение. Парентеральное введение представляет собой любой путь введения, не являющийся пероральным/энтеральным путем, в результате чего лекарственный препарат избегает разрушения при пресистемном метаболизме в печени. Соответственно, парентеральное введение включает в себя любые инъекции и инфузии, например струйную инъекцию или непрерывную инфузию, как, например, внутривенное введение, внутримышечное введение, подкожное введение. Более того, парентеральное введение включает в себя ингаляционное и местное введение.

Соответственно, средство можно вводить местно таким образом, чтобы оно пересекало любую слизистую оболочку животного, которое должно получать биологически активное вещество, например, в носу, влагалище, глазу, ротовой полости, половых путях, легких, желудочно-кишечном тракте или прямой кишке, предпочтительно, слизистую носа или ротовой полости, и, соответственно, парентеральное введение также может включать в себя буккальное, подъязычное, назальное, ректальное, вагинальное и интраперитонеальное введение, а также легочное и бронхиальное введение посредством ингаляции или инстилляций. Кроме того, средство можно вводить местно таким образом, чтобы оно пересекало кожу.

Обычно предпочтительными являются подкожная и внутримышечная формы парентерального введения.

Местное лечение. Средство согласно настоящему изобретению можно применять в качестве средства для местного лечения, т.е. его можно вводить непосредственно в место (места) приложения действия, как будет описано ниже.

Таким образом, одно средство можно наносить непосредственно на кожу или слизистую, или средство можно вводить инъекцией в пораженную заболеванием ткань или в концевую артерию, ведущую прямо в пораженную заболеванием ткань.

Таким образом, еще один аспект настоящего изобретения относится к способу введения вакцины для лечения и/или предупреждения клинического состояния у субъекта, нуждающегося в этом, предусматривающему стадии:

i) получения композиции, содержащей по меньшей мере одну вакцину согласно настоящему изобретению, и/или

ii) введения субъекту указанной композиции по меньшей мере однократно для профилактики и/или лечения заболевания.

Предпочтительный вариант осуществления относится к способу введения вакцины для лечения и/или предупреждения злокачественной опухоли, которая раскрыта в данном документе, у субъекта, нуждающегося в этом, предусматривающему стадии:

i) получения композиции, содержащей по меньшей мере одну вакцину, которая раскрыта в данном документе, и/или

ii) введения указанной композиции субъекту внутримышечно и/или внутривенно по меньшей мере однократно для профилактики и/или лечения злокачественной опухоли.

Предпочтительный вариант осуществления относится к способу введения вакцины для лечения и/или предупреждения сердечно-сосудистого заболевания, которое раскрыто в данном документе, у субъекта, нуждающегося в этом, предусматривающему стадии:

i) получения композиции, содержащей по меньшей мере одну вакцину, которая раскрыта в данном документе, и/или

ii) введения указанной композиции субъекту внутримышечно и/или внутривенно по меньшей мере однократно для профилактики и/или лечения сердечно-сосудистого заболевания.

В соответствии с другим вариантом осуществления вакцину согласно настоящему изобретению вводят посредством любого типа инъекций или инфузий, выбранных из группы струйной инъекции, непрерывной инфузий, внутривенного введения, внутримышечного введения, подкожного введения, ингаляции или местного введения или их комбинации. В соответствии с конкретным вариантом осуществления вакцину вводят посредством внутримышечного введения и/или внутривенного введения.

В медицине бустер-доза представляет собой дополнительное введение вакцины после предшествующей дозы. После первоначальной иммунизации бустер-инъекция или бустер-доза представляет собой повторное воздействие на клетку иммунизирующим антигеном. Она предназначена для повторного по-

вышения иммунитета против данного антигена до уровней, обеспечивающих защиту, после того как наблюдали, что они понизились, или спустя определенный период. В соответствии с вариантом осуществления вакцину согласно настоящему изобретению вводят любое число раз от одного, двух, трех, четырех раз или более.

В соответствии с дополнительным вариантом осуществления действие вакцины усиливают посредством введения в форме, отличной от предыдущего введения, и/или в часть тела, отличную от той, в которую осуществлялось предыдущее введение. В соответствии с другим вариантом осуществления вакцину вводят в область, которая, наиболее вероятно, содержит данное заболевание или инфекцию, для предупреждения/снижения риска возникновения которых предназначена вакцина.

В соответствии с другим вариантом осуществления реципиент вакцины (субъект) согласно настоящему изобретению представляет собой животное, например, млекопитающее, такое как *Homo sapiens*, корова, свинья, лошадь, овца, коза, лама, мышь, крыса, обезьяна, и/или курицу. В соответствии с конкретным вариантом осуществления субъект представляет собой *Homo sapiens*.

Введение более чем одной вакцины является известным в уровне техники и называется в данном подходе совместной вакцинацией или применением коктейля вакцин. Таким образом, в соответствии с вариантом осуществления вакцину вводят совместно с любой другой вакциной. В соответствии с другим вариантом осуществления вакцина образует часть коктейля вакцин.

Набор.

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к набору, содержащему:

- i) композицию, содержащую вакцину согласно настоящему изобретению, и/или
- ii) медицинский инструмент или другие средства для введения вакцины, и/или
- iii) инструкции к применению набора.

В соответствии с вариантом осуществления набор содержит второй активный ингредиент или компонент вакцины для терапевтического применения в лечении или предупреждении одного или нескольких из заболеваний, раскрытых в настоящем изобретении.

В соответствии с вариантом осуществления вакцину согласно настоящему изобретению вводят раздельно, последовательно или одновременно по меньшей мере с одним отличным фармацевтическим активным ингредиентом и/или компонентом вакцины.

Дозировки и схемы дозирования.

Требования к дозировке будут изменяться вместе с конкретной используемой для лекарственного средства композицией, путем введения и конкретным субъектом, подлежащим лечению. Специалисту в данной области техники также будет понятно, что оптимальное количество доз и интервал между отдельными дозами соединения будут определяться, исходя из природы и степени тяжести состояния, подлежащего лечению, формы, пути и места введения, а также конкретного пациента, получающего лечение, и что такие оптимальные условия можно определить с помощью традиционных методик. Специалисту в данной области техники также будет понятно, что оптимальный курс лечения, т.е. количество доз соединения, получаемых за сутки в течение определенного количества суток, может быть определен с применением общепринятых исследований по определению курса лечения.

Термин "единичная лекарственная форма" относится к физически дискретным единицам, подходящим в качестве единичных доз для субъектов-людей и субъектов-животных, причем каждая единица содержит предварительно определенное количество соединения отдельно или в комбинации с другими средствами, которое, согласно расчетам, является количеством, достаточным для получения желаемого эффекта, совместно с фармацевтически приемлемым разбавителем, носителем или средой. Характеристики единичных лекарственных форм согласно настоящему изобретению зависят от конкретного используемого соединения или соединений и от эффекта, которого нужно достичь, а также от фармакодинамических характеристик, ассоциированных с каждым соединением у хозяина. Вводимая доза должна составлять "эффективное количество" или количество, необходимое для достижения "эффективного уровня" у отдельного пациента.

В случае, когда в качестве предпочтительного конечного критерия оценки для дозирования используется "эффективный уровень", фактическая доза и режим могут изменяться в зависимости от различий фармакокинетических характеристик, распределения лекарственного средства, возраста, пола, роста, состояния здоровья и метаболизма у индивидов. "Эффективный уровень" можно определить, например, как уровень в крови или ткани, который является желательным у пациента и соответствует концентрации одного или нескольких соединений согласно настоящему изобретению.

Примеры

Модификация VLP без нарушения точного и чувствительного процесса самосборки является проблемой. Авторами настоящего изобретения представлены несколько примеров успешного введения SpyTag в различные петли VLP без нарушения процесса самосборки. Приведенные ниже примеры не ограничивают объем настоящего изобретения.

Конструирование гена SpyTag-AP205.

Синтетическую последовательность Spytag-AP205 конструировали посредством слияния последовательности SpyTag (AHIVMVDAYKPTK) SEQ ID NO: 36 с любым из N- и/или C-конца AP205 (SEQ ID

NO: 58) с использованием спейсерной последовательности (GSGTAGGGSGS для слияния SpyTag с N-концом; или GGSG для слияния SpyTag с C-концом) между последовательностями AP205 и SpyTag. Последовательность гена дополнительно модифицировали таким образом, чтобы она содержала сайт рестрикции NcoI на N-конце, а за C-концевым стоп-кодоном следовал сайт рестрикции NcoI. Последовательность гена может быть оптимизирована с точки зрения использования кодонов для экспрессии в клетках *Escherichia coli* или других экспрессионных системах, а также может быть синтезирована с помощью Geneart, Life Technologies. Другие конструкции для слитого белка AP205/фаг fr и SpyTag согласно настоящему изобретению получали с применением подобного подхода.

Конструирование гена SpyCatcher-AP205.

Синтетическую последовательность Spycatcher-AP205 конструировали посредством слияния последовательности SpyCatcher SEQ ID NO: 37 с N-концом AP205 (SEQ ID NO: 58) с использованием спейсерной последовательности (GGSGS) между последовательностями AP205 и SpyCatcher. Последовательность гена дополнительно модифицировали таким образом, чтобы она содержала сайт рестрикции NcoI на N-конце. Последовательность гена может быть оптимизирована с точки зрения использования кодонов для экспрессии в клетках *Escherichia coli* или других экспрессионных системах, а также может быть синтезирована с помощью Geneart, Life Technologies.

Конструирование гена SpyCatcher-фаг fr.

Синтетическую последовательность Spycatcher-фаг fr конструировали посредством слияния последовательности SpyCatcher SEQ ID NO: 37 с N-концом фага fr (SEQ ID NO: 59) с использованием спейсерной последовательности (GGSGS) между последовательностями фага fr и SpyCatcher. Последовательность гена дополнительно модифицировали таким образом, чтобы она содержала сайт рестрикции NcoI на N-конце, а за C-концевым стоп-кодоном следовал сайт рестрикции NcoI. Последовательность гена может быть оптимизирована с точки зрения использования кодонов для экспрессии в клетках *Escherichia coli* или других экспрессионных системах, а также может быть синтезирована с помощью Geneart, Life Technologies.

Экспрессия и очистка VLP на основе AP205 и/или фага fr.

Плазмиды трансформировали в *E.coli* BL21 или JM109. Культуру для посева получали, инокулируя одну колонию в среду 2xYT, содержащую 100 мг/л ампициллина, и культуру выращивали в течение ночи при 28°C со встряхиванием. Для экспрессии выращенную за ночь культуру разводили в среде 2xYT, содержащей 100 мг/л ампициллина, и выращивали до достижения значения OD600 (оптическая плотность при длине волны 600 нм) 0,5-0,8 при 37°C со встряхиванием. Культуру затем подвергали индукции с использованием IPTG (изопропилтиогалактозид) (конечная концентрация 0,4 мМ) и выращивали в течение 4 ч при 28°C или в течение 20 ч при 18-20°C с интенсивной аэрацией. Клетки ресуспендировали в 20 мМ натрий-фосфатном буфере с pH 7,2, 20 мМ NaCl, содержащем ингибиторы протеаз, и лизировали посредством ультразвуковой обработки при 80% мощности с 5 импульсными воздействиями в течение 2 периодов по 5 мин на льду (эффективная мощность 25 Вт). Лизаты осветляли с использованием центрифугирования при 40000G в течение 30 мин и очищали с помощью колонки Hitrap SP HP с использованием возрастающей концентрации NaCl при pH 7,2. Некоторые VLP дополнительно очищали с использованием ультрацентрифугирования в градиенте плотности йодиксанола (Optiprep). Вкратце, лизат (содержащий VLP) вначале осветляли посредством центрифугирования при 5000×g и супернатант затем наслаивали на градиент плотности Optiprep (27/33/39%). VLP очищали с помощью центрифугирования в градиенте плотности в роторе SW60i при 47800 об/мин в течение 3,5 ч (16°C). Optiprep впоследствии удаляли посредством диализа O/N (в течение ночи) против PBS буфера с pH 7,2, 0,02% PS80 с использованием диализной трубки с величиной MWCO (номинальное отсечение по молекулярной массе) 300000 кДа. Концентрации очищенных белков определяли с помощью BCA (бицинхиноновая кислота) анализа.

Конструирование гена и рекомбинантная экспрессия связывающихся со SpyTag вакцинных антигенов.

Гетерологичные вакцинные антигены подвергали слиянию с помощью генетических методов при использовании линкера GGS либо на их C-конце, либо на N-конце с ранее описанной (WO 2011098772 A1) сконструированной SpyCatcher (SEQ ID NO: 37 (или 60 или 61)), таким образом предоставляя экспрессируемым слитым белкам антигенов способность к связыванию со SpyTag. Гены слитых белков SpyCatcher-антиген, экспрессируемые в *E.coli*, конструировали с использованием метки из 6 гистидинов и сайтов рестрикции NcoI/BamHI для субклонирования в вектор pET-15b. Гены слитых белков SpyCatcher-антиген экспрессировали или в S2 клетках, или в клетках эмбриональной почки человека 293 (HEK293), или в инфицированных бакуловирусом клетках насекомых; конструировали с использованием фланкирующих сайтов EcoRI/BamHI (N-конец) и NotI (C-конец), а также метки из 6 гистидинов и субклонировали в вектор pHP34s, pcDNATM4/HisMax или pAcGP67A (BD Biosciences) соответственно.

Все сконструированные белки оболочки экспрессировали в *E.coli* и очищали посредством ультрацентрифугирования в ступенчатом градиенте OptiprepTM (23%/29%/35%). Продуктивность экспрессии определяли с помощью BCA анализа. Сборку VLP подтверждали с помощью трансмиссионной электронной микроскопии и/или анализа динамического рассеяния света. Для оценки способности к связыва-

нию с антигеном отдельные белки оболочки VLP вначале инкубировали при 4°C в течение 24 ч с соответствующим антигеном, слитым со SpyTag или SpyCatcher (смешанными в молярном отношении 1:1), и каждый образец затем анализировали с помощью анализа методом SDS-PAGE (электрофорез в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия)/денситометрического анализа для оценки количества антигена, которое связалось вследствие взаимодействия SpyTag-SpyCatcher с белком оболочки в VLP. Результаты кратко изложены в табл. 4.

Таблица 4. Сравнение различных сконструированных белков оболочки AP205 и фага fr в отношении продуктивности рекомбинантной экспрессии, способности к сборке в вирусоподобную частицу (VLP) и их способности к экспонированию антигена

Название VLP	SEQ ID NO.	Продуктивность рекомбинантной экспрессии	Сборка VLP	Способность к связыванию с антигеном
	Белок (ДНК)	нет/низкая/высокая	Да/нет	-, +, ++, +++
SpyTag-AP205	62 (63)	Высокая	Да	++
AP205-SpyTag	64 (65)	Высокая	Да	+
SpyTag-AP205-SpyTag	71 (72)	Высокая	Да	+++
AP205-ggsg-SpyCatcher	74 (73)	Низкая	Нет	Нет данных
SpyCatcher-ggsg-AP205	76 (75)	Высокая	Да	++
SpyTag-фар FR	66 (67)	Низкая	Да	+
SpyCatcher-фар FR	78 (77)	Низкая	Нет	-

Влияние положения SpyTag на белке капсида AP205 показано на фиг. 12. Как можно увидеть, слияние на N-конце AP205 дает в результате несколько лучшую способность к связыванию по сравнению со слиянием на C-конце.

Оценка качества SpyTag-VLP и SpyCatcher-VLP с помощью электронной микроскопии.

Для подтверждения целостности химерных SpyTag-VLP и SpyCatcher-VLP аликвоту разведенных частиц помещали на слюдяные сетки 200 меш с угольной пленкой, контрастно окрашивали 2% фосфорновольфрамовой кислотой (pH 7,0) и оценивали с помощью трансмиссионной электронной микроскопии (ТЕМ) с использованием CM 100 BioTWIN (фиг. 3 и 6). Как можно увидеть при сравнении фиг. 3 и 6 с фиг. 11, полученные в данном случае VLP на основе AP205 имеют такую же общую структуру, что и немодифицированные VLP на основе AP205.

Оценка качества SpyTag-VLP и SpyCatcher-VLP с помощью динамического рассеяния света.

Для подтверждения размера и полидисперсности частиц химерных SpyTag-VLP и SpyCatcher-VLP аликвоту частиц вначале освещали посредством центрифугирования при 16000G в течение 10 мин. Супернатант переносили в одноразовую микрокювету и оценивали с помощью динамического рассеяния света (DLS) с использованием DynaPro NanoStar (фиг. 9 и 10).

Подтверждение связывания слитого белка SpyCatcher-антиген на VLP, содержащей Spytag.

Общие количества антигена, связавшегося на VLP, оценивали посредством ультрацентрифугирования в градиенте плотности смеси слитых белков VLP:spytag и антиген:SpyCatcher с последующим анализом фракции VLP методом SDS-PAGE (фиг. 4). Стехиометрическое соотношение между полосами, соответствующими неконъюгированному слитому белку SpyTag-белок капсида AP205 и конъюгированному комплексу SpyCatcher-антиген-белок капсида AP205, показывает эффективность связывания. Стехиометрическое соотношение может быть модифицировано посредством добавления варьирующих количеств слитого со SpyCatcher антигена.

VLP также исследовали с помощью трансмиссионной электронной микроскопии для оценки их целостности после связывания с различными слитыми белками SpyCatcher-антиген (фиг. 5). В частности, аликвоту разведенных частиц (после связывания со SpyCatcher) помещали на слюдяные сетки 200 меш с угольной пленкой, контрастно окрашивали 2% фосфорновольфрамовой кислотой (pH 7,0) и оценивали с помощью трансмиссионной электронной микроскопии (ТЕМ) с использованием CM 100 BioTWIN. Оценивали размер и полидисперсность VLP после связывания с различными слитыми белками SpyCatcher-антиген (фиг. 9). В частности, аликвоту освещали посредством ультрацентрифугирования, и переносили в кювету и оценивали с помощью динамического рассеяния света (DLS) с использованием DynaPro NanoStar.

На фиг. 13 показана связывающая способность VLP на основе AP205 для связывания с антигеном в случае, когда AP205 не является слитым со SpyTag, является слитым с одной SpyTag на N-конце или является слитым с двумя SpyTag как на N-, так и на C-конце соответственно. Данные SDS-PAGE показывают, что слитый белок SpyTag-AP205-SpyTag может связываться либо с одним, либо с двумя слитыми белками SpyCatcher-антиген на белок оболочки, слитый белок SpyTag-AP205 может связываться с одним слитым белком SpyCatcher-антиген на белок оболочки, и AP205 не может связываться с какими-либо

слитыми белками SpyCatcher-антиген. Сравнение интенсивности окрашивания полос отдельных белков показывает, что слитый белок SpyTag-AP205-SpyTag (SAS) (SEQ ID NO: 71(72)) может связываться с большим количеством антигена по сравнению со слитым белком SpyTag-AP205 (SA) (SEQ ID NO: 62).

На фиг. 14 показана связывающая способность для VLP на основе слитого белка SpyTag-AP205-SpyTag со слитым белком SpyCatcher-Pfs25. Данные SDS-PAGE показывают, что слитый белок SpyTag-AP205-SpyTag может связываться либо с одним, либо с двумя антигенами Pfs25 на белок оболочки, тогда как VLP на основе AP205 не связываются с антигеном Pfs25.

Подтверждение связывания слитого белка SpyTag-антиген на VLP со SpyCatcher. Общие количества антигена, связавшегося на VLP, оценивали посредством ультрацентрифугирования в градиенте плотности смеси VLP:SpyCatcher и антиген:SpyTag с последующим анализом фракции VLP методом SDS-PAGE (фиг. 7). Стехиометрическое соотношение между полосами, соответствующими неконъюгированному слитому белку SpyCatcher-белок капсида AP205 и конъюгированному комплексу SpyCatcher-AP205-SpyTag-антиген, показывает эффективность связывания. Стехиометрическое соотношение может быть модифицировано посредством добавления варьирующих количеств слитого со SpyTag антигена.

VLP также исследовали с помощью трансмиссионной электронной микроскопии для оценки их целостности после связывания с различными слитыми белками SpyTag-антиген (фиг. 8). В частности, аликвоту разведенных частиц (после связывания со слитым белком SpyTag-антиген) помещали на слюдяные сетки 200 меш с угольной пленкой, контрастно окрашивали 2% фосфорновольфрамовой кислотой (pH 7,0) и оценивали с помощью трансмиссионной электронной микроскопии (ТЕМ) с использованием CM 100 BioTWIN. Оценивали размер и полидисперсность VLP после связывания с различными слитыми белками SpyTag-антиген (фиг. 10). В частности, аликвоту осветляли посредством ультрацентрифугирования, и переносили в кювету, и оценивали с помощью динамического рассеяния света (DLS) с использованием DynaPro NanoStar.

Универсальность платформы для презентирования антигенов на основе VLP Авторами настоящего изобретения были успешно сконструированы VLP, способные экспонировать ряд антигенов, которые кратко описаны в табл. 5.

Таблица 5. Краткое описание

SEQ ID NO:	Антиген	Подтвержденное связывание	Подтвержденное связывание	Подтвержденное связывание	Подтвержденное связывание	Подтвержденное связывание

белка (ДНК)		со слитым белком SpyTag- AP205 (SEQ ID NO: 62)	со слитым белком SpyTag- AP205- SpyTag (SEQ ID NO: 71)	со слитым белком LongSpy- Tag-AP205- LongSpy-Tag (SEQ ID NO: 92)	со слитым белком Spy- Catcher- AP205 (SEQ ID NO: 74)	со слитым белком SpyTag-fr (SEQ ID NO: 66)
18	SpyCatcher- Her2-ECD 23- 686	Да	Да			
19	SpyCatcher-IL- 5(C63T/C105T)	Да	Да			Да
20 (29)	PCSK9 31- 692 :Spy- Catcher:HIS	Да	Да			
21 (30)	SpyCatcher- ID1ID2a-HIS				Да	
24 (33)	GMZ2:SpyC	Да	Да	Да		
27	SpyCatcher- Pfs25-HIS	Да	Да			
28	HIS- PfCSP(aa92- 397)- SpyCatcher	Да	Да			
84 (85)	AG85A (SpyCatcher)	Да	Да			
86 (87)	SpyC:сyрвиви н (MP1804)	Да	Да			
52 (53)	Spycatcher- ggs-CIDR1a- HIS	Да	Да			
1 (2)	L2(aa11-88 x5)-ggs- spycatcher	Да	Да			
3 (4)	SpyCatcher- R0.Pf6C	Да	Да			
5 (6)	SpyCatcher Pf6C	Да	Да			

7 (8)	SpyTag-DBL1-ID2a				Да	
9 (10)	PDL1-SpyTag				Да	
11 (12)	CTLA-4-SpyTag				Да	
14 (15)	SpyTag-L-DER P2				Да	
16 (17)	mini-HA-Stem-HIS-SpyT				Да	

Иммунологическое исследование платформы для презентирования антигенов на основе VLP.

Для оценки иммунологического эффекта описанной платформы для презентирования антигенов на основе VLP осуществляли иммунизацию групп мышей (n=5) либо антигеном, связанным с VLP, либо несвязанным растворимым антигеном (контрольная группа), составленными с посторонним адъювантом или без него. С учетом возможности того, что VLP на основе AP205 сами могут обладать эффектом адъюванта, авторы настоящего изобретения дополнительно включили подобное количество немодифицированных VLP на основе AP205 (т.е. без слитой SpyTag или SpyCatcher) в составы вакцин контрольной группы. С каждой мышью проводили три внутримышечных иммунизации (объем 50 мкл вводили инъекцией в каждую переднюю большеберцовую мышцу) в день 1, 21 и 42 и образцы сыворотки собирали через две недели или три месяца после каждой иммунизации для последующего анализа.

Для изучения кинетических характеристик гуморальных иммунных реакций общее количество антигенспецифических иммуноглобулинов в образцах сыворотки мышей, собранных после 1-, 2- и 3-й иммунизации соответственно, измеряли в анализе методом ELISA с использованием "голого" вакцинного антигена (т.е. без spyTag или SpyCatcher) в качестве захватывающего антигена на твердой фазе (планшеты покрывали антигеном в концентрации 1 мкг/мл). Титр антител в сыворотке от мышей, иммунизированных связанным с VLP антигеном, затем сравнивали относительно титра в контрольной группе для оценки эффекта экспонирования антигена на VLP как по пиковым титрам антител, так и в плане кинетических характеристик, т.е. как быстро развивается гуморальный иммунный ответ, и какова его величина в ходе вакцинации по схеме. В частности, трехкратное разведение сыворотки, начиная с соотношения 1:100 вплоть до 1:5904900 осуществляли для сравнения гуморальных иммунных ответов в двух группах животных, иммунизированных либо антигеном, конъюгированным с VLP, либо несвязанным антигеном.

Для сравнения продолжительности индуцированных гуморальных реакций у вакцинированных VLP мышей и мышей, иммунизированных растворимым слитым белком SpyCatcher-антиген или SpyTag-антиген (контрольная группа), образцы сыворотки собирали каждую третью неделю после последней проведенной иммунизации в течение всего года (или до тех пор, пока не наблюдали значимое различие между опытной и контрольной группами), и их исследовали в вышеописанном анализе методом ELISA.

На фиг. 15 показан ответ в виде выработки Ig против антигена, связанного со SpyTag (SEQ ID NO: 7), через две недели после иммунизации по схеме примирование-бустер-иммунизация-бустер-иммунизация (вакцины, составленные без геля гидроксида алюминия). Растворимый слитый белок SpyTag-антиген и AP205 были неспособны к связыванию с антигеном. Иммунизация мышей экспонируемым на VLP слитым белком SpyTag-антиген (SEQ ID NO: 7), индуцирует более сильный ответ в виде выработки Ig по сравнению с мышами, иммунизированными растворимыми слитым белком SpyTag-Ag (SEQ ID NO: 7) и AP205 (SEQ ID NO: 58).

На фиг. 16 показан ответ в виде выработки Ig против антигена, связанного со SpyCatcher (SEQ ID NO: 27), через три месяца после иммунизации по схеме примирование-бустер-иммунизация-бустер-иммунизация. Иммунизация мышей VLP, экспонирующей слитый белок SpyCatcher-антиген (SEQ ID NO: 27), индуцирует более сильный ответ в виде выработки Ig по сравнению с мышами, иммунизированными растворимым слитым белком SpyCatcher-антиген (SEQ ID NO: 27) и AP205 (SEQ ID NO: 58).

На фиг. 15 и 16 показано, что вакцины на основе VLP, раскрытые в данном документе, могут индуцировать повышенные титры антител.

Анализировали avidность антител, образование которых индуцировалось у мышей после иммунизации по схеме примирование-бустер-иммунизация-бустер-иммунизация (фиг. 17 и 18). Мышиные анти-сыворотки получали через четыре месяца после последней иммунизации. Иммунизация мышей антигеном, экспонированным на VLP (SEQ ID NO: 27), приводит к антителам со значительно более высокой avidностью по сравнению с антителами от мышей, иммунизированных растворимым слитым белком SpyCatcher-антиген (SEQ ID NO: 27) и AP205 (SEQ ID NO: 58) (фиг. 17). Обе вакцины были составлены с гелем гидроксида алюминия. Это различие статистически исследовалось с использованием непараметрического двухвыборочного критерия суммы рангов Уилкоксона (Манна-Уитни), что давало в результате оценку вероятности $P > |z| = 0,00002$.

На фиг. 18 показана avidность антител, полученных из пула сывороток от мышей, иммунизированных слитым белком SpyCatcher-AP205 (SEQ ID NO: 76), связанным со слитым белком SpyTag-антиген (SEQ ID NO: 7). Серым столбиком представлен пул сывороток от мышей, иммунизированных растворимым слитым белком SpyTag-Ag (SEQ ID NO: 7) и AP205 (SEQ ID NO: 58), который является неспособным к связыванию с антигеном. Обе вакцины были составлены без геля гидроксида алюминия. Иммунизация мышей слитым белком SpyCatcher-AP205 (SEQ ID NO: 76), связанным со слитым белком SpyTag-антиген (SEQ ID NO: 7), приводила в результате к индукции выработки антител с более высокой avidностью по сравнению с антителами от мышей, иммунизированных растворимым слитым белком SpyTag-Ag (SEQ ID NO: 7) и AP205 (SEQ ID NO: 58).

Взятые в совокупности результаты с фиг. 17 и 18 показывают, что данные вакцины на основе VLP можно применять для индукции выработки антител с повышенной avidностью по сравнению с вакцинами на основе соответствующих растворимых белков.

Авторы настоящего изобретения также анализировали, как быстро индуцировалась выработка антител после вакцинации экспонированными на VLP антигенами (фиг. 19). Ответ в виде выработки Ig против антигена (SEQ ID NO: 52) после одной иммунизации анализировали (фиг. 18) у отдельных мышей, иммунизированных слитым белком SpyTag-AP205 (SEQ ID NO: 62), связанным со слитым белком SpyCatcher-антиген (SEQ ID NO: 52), или растворимым слитым белком SpyCatcher-антиген (SEQ ID NO: 52) и AP205 (SEQ ID NO: 58), который является неспособным к связыванию с антигеном. Обе вакцины были составлены с гелем гидроксида алюминия. Одна иммунизация мышей слитым белком SpyTag-AP205 (SEQ ID NO: 62), связанным со слитым белком SpyCatcher-антиген (SEQ ID NO: 52), индуцировала более быстрый ответ в виде выработки Ig по сравнению с мышами, иммунизированными растворимым слитым белком SpyCatcher-антиген (SEQ ID NO: 52) и AP205 (SEQ ID NO: 58).

Такой же эксперимент осуществляли на мышах, иммунизированных слитым белком SpyTag-AP205-SpyTag (SEQ ID NO: 71), связанным со слитым белком SpyCatcher-антиген (SEQ ID NO: 27), или растворимым слитым белком SpyCatcher-антиген (SEQ ID NO: 27) и AP205 (SEQ ID NO: 58), который является неспособным к связыванию с антигеном (фиг. 20). Обе вакцины были составлены с гелем гидроксида алюминия. Одна иммунизация мышей слитым белком SpyTag-AP205-SpyTag (SEQ ID NO: 71), связанным со слитым белком SpyCatcher-антиген (SEQ ID NO: 27), индуцировала более быстрый ответ в виде выработки Ig по сравнению с мышами, иммунизированными растворимым слитым белком SpyCatcher-антиген (SEQ ID NO: 27) и AP205 (SEQ ID NO: 58).

Данные, представленные на фиг. 19 и 20, показывают, что одна иммунизация презентруемыми на VLP антигенами приводит в результате к более быстрой индукции выработки антител.

Предполагалось, что человеческие В-клетки памяти играют роль в поддержании уровней антител в сыворотке со временем, и, следовательно, для оценки потенциала платформы для презентирования антигенов на основе VLP в отношении индукции длительной иммунологической памяти авторы настоящего изобретения сравнивали способность вакцины на основе VLP образовывать В-клетки памяти относительно таковой способности у вакцины на основе растворимого антигена (контроль). Анализ ELISPOT В-клеток памяти представляет собой принятый стандарт для измерения относительной частоты обнаружения В-клеток памяти и основывается на выявлении В-клеток памяти, которые дифференцировались в плазматические клетки после стимуляции тремя поликлональными стимулами (CpG, *Staphylococcus aureus* Cowan (SAC, Sigma) и митоген фитолакки (PWM, Sigma)). После стимуляции подсчитывали количество антигенспецифичных В-клеток памяти и общее количество В-клеток памяти и соотношение между количеством пятен для антигенспецифичных клеток и общим количеством пятен для В-клеток памяти оценивали и выражали в процентах.

Антигенспецифичное качественное исследование индуцированных иммунных реакций.

Исследование платформы на основе VLP:SpyTag и SpyCatcher:VLP, соответственно, для индукции VAR2CSA-специфичных антител.

Для количественной оценки индуцированных гуморальных иммунных реакций авторы настоящего изобретения проводили оптимизированный анализ ингибирования связывания с паразитом, в котором исследуется способность собранных образцов сыворотки к ингибированию связывания между человеческим рецептором хондроитинсульфата А (CSA) и зараженными паразитом эритроцитами, экспрессирующими лиганд VAR2CSA. Его осуществляли посредством нанесения в виде покрытия на 96-луночные планшеты очищенного CSA рецептора и добавления меченых радиоактивной меткой малярийных паразитов, экспрессирующих VAR2CSA в присутствии или в отсутствие специфичных в отношении VAR2CSA антител в сыворотке от животных, иммунизированных VLP, конъюгированными с VAR2CSA (SpyCatcher-ID1ID2a/SpyTag-ID1ID2a), или только растворимым антигеном VAR2CSA (SpyCatcher-ID1ID2a/SpyTag-ID1ID2a). Другое измерение качественного параметра функционального ответа с выработкой IgG заключается в оценке общего количества опсонизирующего IgG в образце сыворотки. Его осуществляли посредством инкубирования экспрессирующих VAR2CSA малярийных паразитов с сывороткой при 5-кратной серии разведений, начиная с 1:100, за которым следовала отмывка инфицированных эритроцитов и выявление связанного VAR2CSA-специфичного IgG с использованием конъюгированного с Alexa488 вторичного антитела, специфичного в отношении IgG мыши/крысы или кролика, с

последующим анализом с помощью проточной цитометрии.

В частности, функциональный гуморальный иммунный ответ оценивали посредством измерения способности мышиных антисывороток к ингибированию связывания между нативным VAR2CSA, экспрессируемым на зараженных паразитом эритроцитах, и CSA в статическом анализе связывания. Инфицированные *P.falciparum* (генотип FCR3) эритроциты, экспрессирующие нативный VAR2CSA, вначале инкубировали с мышиной антисывороткой (3-кратная серия разведений, начиная с 1:20), а затем обеспечивали возможность их инкубирования на покрытых декорином планшетах в течение 90 мин. Несвязавшиеся IE смывали, а оставшиеся IE подсчитывали. Нормализованное связывание с паразитом после инкубирования с собранными в пул антисыворотками от мышей (n=5), вакцинированных слитым белком SpyTag-ID1ID2a (SEQ ID NO: 82), конъюгированным со SpyCatcher-VLP (SEQ ID NO: 76), или растворимым слитым белком SpyTag-ID1ID2a (SEQ ID NO: 82), смешанным с немодифицированными VLP на основе AP205 (SEQ ID NO: 58), показаны после первой (▲), второй (■) и третьей (●) иммунизации (фиг. 25). В анализе показано, что антисыворотки от мышей, иммунизированных слитым белком SpyTag-ID1ID2a, конъюгированным с VLP (SEQ ID NO: 82), характеризовались большей способностью к ингибированию связывания по сравнению с антисыворотками от мышей, иммунизированных растворимым слитым белком SpyTag-ID1ID2a (SEQ ID NO: 82).

Исследование платформы на основе VLP:SpyTag и SpyCatcher:VLP, соответственно, для индукции гуморального иммунитета против аутоантигенов.

Для демонстрации способности платформы на основе VLP:SpyTag и SpyCatcher:VLP, соответственно, нарушать иммунологическую толерантность к аутоантигенам, ассоциированным как с сердечно-сосудистым заболеванием (PCSK9), иммуновоспалительным заболеванием (IL-5), так и со злокачественной опухолью (Her2/сургивин), авторы настоящего изобретения обеспечивали генетическое слияние аутоантигенов со SpyCatcher или SpyTag и связывали их на VLP со SpyTag или Spycatcher, соответственно, как описано ранее. В некоторых случаях (IL-5, сургивин, CTLA-4 и PD-L1) авторами настоящего изобретения вначале использовались мышиные гомологи генов для иммунизации мышей. В частности, используемая методика работы заключалась в том, чтобы сначала связать HER2 (SpyCatcher:Her2-ECD|23-686|), сургивин, IL-5 (SpyCatcher:IL-5 (C63T/C105T)) и PCSK9(PCSK9|31-692|:SpyCatcher-HIS) с VLP, содержащими SpyTag, или, подобным образом, связать (SpyTag:Her2-ECD|23-686|), сургивин, IL-5(SpyTag:IL-5 (C63T/C105T)) с VLP, содержащими SpyCatcher. Затем авторы настоящего изобретения использовали VLP со связанным антигеном для иммунизации мышей и измеряли сероконверсию у животных в группе а) мышей, иммунизированных конъюгированными VLP, и б) мышей, иммунизированных несвязанным растворимым антигеном и немодифицированными VLP (т.е. без SpyTag/SpyCatcher). Титр антигенспецифичных иммуноглобулинов оценивали в 3-кратных сериях разведений сывороток. Положительная сероконверсия определяется как результаты измерения OD, полученные в анализе ELISA, которые на 2 величины стандартного отклонения превышают значение у иммунизированного плацебо животного. Конверсию сыворотки и индукцию выработки специфичных антител к HER2 и сургивину дополнительно подтверждали с помощью Вестерн-блоттинга с использованием сывороток и клеточных лизатов из различных линий злокачественных клеток (например, клеток меланомы, злокачественной опухоли предстательной железы, молочной железы и легкого).

Этот эксперимент проводили с IL-5, CTLA-4 и PD-L1.

Ответ в виде выработки Ig против аутоантигена IL-5 (SEQ ID NO: 19) анализировали через пять месяцев после иммунизации по схеме примирование-бустер-иммунизация-бустер-иммунизация. Отдельных мышей иммунизировали слитым белком SpyTag-AP205-SpyTag (SEQ ID NO: 71), связанным со слитым белком SpyCatcher-аутоантиген IL-5 (SEQ ID NO: 19), или растворимым слитым белком SpyCatcher-антиген (SEQ ID NO: 19) и AP205 (SEQ ID NO: 58), который является неспособным к связыванию со слитым белком SpyCatcher-антиген. Обе вакцины были составлены в геле гидроксида алюминия. Иммунизация мышей VLP, экспонирующей аутоантиген (SEQ ID NO: 19), приводила в результате к нарушению иммунологической толерантности и индукции выработки антигенспецифичных антител, тогда как иммунизация растворимым (не экспонируемым) аутоантигеном (SEQ ID NO: 19) не индуцировала выработку антигенспецифичных антител (фиг. 21).

Ответ в виде выработки Ig против аутоантигена CTLA-4 (SEQ ID NO: 11) через две недели после иммунизации по схеме примирование-бустер-иммунизация анализировали у отдельных мышей, иммунизированных слитым белком SpyTag-AP205-SpyTag (SEQ ID NO: 71), связанным с аутоантигеном CTLA-4 (SEQ ID NO: 11), или растворимым слитым белком SpyCatcher-антиген (SEQ ID NO: 11) и AP205 (SEQ ID NO: 58), который является неспособным к связыванию со слитым белком SpyCatcher-антиген. Обе вакцины были составлены в геле гидроксида алюминия. Иммунизация мышей VLP, экспонирующей аутоантиген (SEQ ID NO: 11), приводила в результате к нарушению иммунологической толерантности и индукции выработки антигенспецифичных антител, тогда как иммунизация растворимым (не экспонируемым) аутоантигеном (SEQ ID NO: 11) не индуцировала выработку антигенспецифичных антител (фиг. 22).

Ответ в виде выработки Ig против аутоантигена PD-L1 (SEQ ID NO: 9) через две недели после иммунизации по схеме примирование-бустер-иммунизация анализировали у отдельных мышей, иммунизированных слитым белком SpyTag-AP205-SpyTag (SEQ ID NO: 71), связанным с аутоантигеном PD-L1

(SEQ ID NO: 9), или растворимым аутоантигеном (SEQ ID NO: 9) и AP205 (SEQ ID NO: 58), который является неспособным к связыванию со слитым белком SpyCatcher-антиген. Обе вакцины были составлены в геле гидроксида алюминия. Иммунизация мышей VLP, экспонирующей аутоантиген (SEQ ID NO: 9), приводила в результате к нарушению иммунологической толерантности и индукции выработки антигенспецифичных антител, тогда как иммунизация растворимым (не экспонируемым) аутоантигеном (SEQ ID NO: 9) не индуцировала выработку антигенспецифичных антител (фиг. 23).

Исследование функциональности вакцины с презентированным на VLP антигеном.

Иммунизация вакциной на основе VLP против Pfs25 приводила в результате к индукции выработки функциональных антител, которые были способны блокировать передачу паразитов *Plasmodium falciparum* *in vitro*. Мышей иммунизировали два раза при дозе 2,5 мкг либо А) слитым белком spycatcher-антиген Pfs25 (SEQ ID NO: 27), экспонируемым на VLP на основе SpyTag-AP205-SpyT (SEQ ID NO: 71), либо Б) растворимым слитым белком spycatcher-антиген Pfs25 (SEQ ID NO: 27), смешанным с VLP на основе AP205 (SEQ ID NO: 58), которая является неспособной к связыванию/экспонированию антигена. Обе вакцины были составлены с гелем гидроксида алюминия. Эффективность блокирования передачи для антител оценивали с помощью стандартного анализа с кормлением комаров через мембрану (SMFA) с использованием очищенного IgG из иммунной сыворотки. Результаты показывают, что антитела, выработка которых индуцировалась у мышей, иммунизированных экспонированным на VLP Pfs25 (вакцина на основе VLP), обладали ~100% активностью блокирования передачи при исследовании в *in vitro* анализе SMFA (фиг. 24).

Исследование платформы на основе VLP:SpyTag и SpyCatcher:VLP для индукции выработки антител, ингибирующих злокачественную опухоль.

Разработаны стандартные модели на животных для изучения эффекта иммунизации животных опухолевыми антигенами в отношении роста введенной подкожной опухоли. 100000 опухолевых клеток, экспрессирующих HER2 и/или сурвивин, вводили инъекцией в левый бок. Это осуществляли как у вакцинированных животных, так и у иммунизированных плацебо животных для изучения профилактического эффекта вакцины. Опухолевый рост отслеживали посредством измерения размера растущей опухоли, а также посредством сканирования животного в случае, когда использовали линии опухолевых клеток, трансфицированные люциферазой. В качестве альтернативы, терапевтический эффект вакцины определяли посредством иммунизации животных полученными опухолями и мониторинга регрессии/развития опухоли посредством измерений размера и/или посредством процедур флуоресцентного сканирования.

Исследование платформы на основе VLP:SpyTag и SpyCatcher:VLP для индукции выработки антител к PCSK9, способных к снижению уровня холестерина в плазме/сыворотке.

Целью создания вакцины на основе VLP с антигеном PCSK9 является индукция гуморального ответа, способного к снижению уровня холестерина в крови. Таким образом, для исследования платформы на основе VLP:SpyTag или платформы на основе SpyCatcher:VLP авторами настоящего изобретения измерялись уровни холестерина в образцах плазмы и сыворотки, полученных от иммунизированных VLP-PCSK9 мышей, и их сравнивали относительно уровней, измеренных у мышей, иммунизированных несвязанным антигеном PCSK9, как ранее описывалось в настоящем изобретении. Уровни холестерина в образцах плазмы и сыворотки измеряли с использованием набора для анализа холестерина WAKO Cholesterol E Assay kit (кат. № 439-17501), следуя инструкциям производителя. Разведенные растворы холестеринового стандарта или исследуемых образцов плазмы/сыворотки (объем 4 мкл) добавляли в лунки 96-луночного планшета и добавляли 196 мкл приготовленного реактива для выявления холестерина. Планшет инкубировали в течение 5 мин при 37°C и оптическое поглощение проявляющегося цвета считывали при длине волны 600 нм не позднее 30 мин.

Последовательности

Таблица 6. Обзор последовательностей, раскрытых в изобретении

SEQ ID NO: белка (ДНК)		
		Антигены:
18	A1	>SpyCatcher- Her2-ECD 23-686 (Homo Sapiens)
19	A2	>SpyCatcher-IL-5(C63T/C105T) (Mus musculus)
20 (29)	A3	>PCSK9 31-692 :SpyCatcher:HIS (Homo Sapiens)
21 (30)	A4	>SpyCatcher-ID1ID2a-HIS (Plasmodium falciparum)
22 (31)	A5	>SpyCatcher-RO-HIS (Plasmodium falciparum)
23 (32)	A6	>HIS-RO-SpyCatcher (Plasmodium falciparum)
24 (33)	A7	>HIS-GMZ2ggsSpyCatcher (Plasmodium falciparum)
25 (34)	A8	>HIS-GMZ2T:ggsSpyCatcher (Plasmodium falciparum)
26 (35)	A9	>SpyCatcher-PfRH5-HIS (Plasmodium falciparum)
27	A10	>SpyCatcher-Pfs25-HIS (Plasmodium falciparum)
28	A11	>HIS-PfCSP(aa92-397)- SpyCatcher (Plasmodium falciparum)
40	A12	>Сурвивин: SpyCatcher (Homo Sapiens)
41	A13	> SpyCatcher:сурвивин (Homo Sapiens)
42	A14	>Сурвивин(F101A/L102A): SpyCatcher (Homo Sapiens)

43	A15	> SpyCatcher:сурвивин(F101A/L102A) (Homo Sapiens)
44 (48)	A16	> SpyCatcher:сурвивин(F101A/L102A) (Mus Musculus)
45 (49)	A17	>Сурвивин (F101A/L102A): SpyCatcher (Mus Musculus)
46 (50)	A18	> SpyCatcher:сурвивин (Mus Musculus)
47 (51)	A19	>Сурвивин: SpyCatcher (Mus Musculus)
52 (53)	A20	>SpyCatcher:CIDR1a-HIS
84 (85)	A21	SpyCatcher-Ag85A (Mycobacterium tuberculosis)
86 (87)	A22	SpyCatcher-ggs-сурвивин (Homo Sapiens)
1 (2)		L2(aa11-88 x5)-ggs-spycatcher (вирус папилломы человека)
3 (4)		SpyCatcher-R0.Pf6C (Plasmodium falciparum)
5 (6)		SpyCatcher Pf6C (Plasmodium falciparum)
7 (8)		SpyTag-DBL1-ID2a (Plasmodium falciparum)
9 (10)		PDL1-SpyTag (Mus musculus)
11 (12)		CTLA-4-SpyTag (Mus musculus)
14 (15)		SpyTag-L-DER P2 (Dermatophagoides pteronyssinus)
13		AMA1-SpyTag
88 (89)		Mini-HA-stem-Spytag
90		G-белок вируса инфекционного некроза гемопозитической ткани (IHNV)-SpyTag
91		SpyTag-G-белок IHNV
		Другое
36 (39)		Аминокислотная последовательность SpyTag
37 (54)		SpyCatcher
38		β-нить CnaB2 (KTag)
55		SpyLigase
56		Изопептид Spy0128
57		Split- Spy0128
58		AP205
59		Φar Fr
60		SpyCatcherΔN
61		SpyCatcherΔNC

62 (63)		Spy-AP205
64 (65)		AP205-spy
66 (67)		Spy-φar fr
68		Ktag-AP205
69		AP205-Ktag
70		Ktag-φar fr
71 (72)		Spy-AP205-Spy
74 (73)		<u>AP205-gsgs-Spycatcher</u>
76 (75)		<u>SpyCatcher-gsgs-AP205</u>
78 (77)		<u>SpyCatcher-gsgs-φar fr</u>
79		SpyTag-Her2-ECD 23-686
80		SpyTag-IL-5(C63T/C105T)
81		PCSK9 31-692 :Spytag
82		<u>SpyTag-ID1ID2a-HIS</u>
83		<u>Короткий гибкий линкер</u>
92 (93)		SpyTag-G-белок IHNV
94 (95)		ДНК mSA-AP205

>SEQ ID NO: 1 L2(aa11-88 x5)-ggs-spycatcher

MKRASATQLYKTCKQAGTCPPDIIPKVEGKTIADQILQYGSMSGVFFGGLGIGTGSGTG
GRTGYIPLGTRPPTATDTLAKRASVTDLYKTCKQSGTCPPDVVPKVEGTTLADKILQ
WSSLGIFLGGLGIGTGSGTGGRGTGYIPLGGRSNTVVVDVGPKRASATQLYQTCKLTGTC
PPDVIPKVEHNTIADQILKWGSLGVFFGGLGIGTGSGTGGRGTGYVPLGTSAPKPSITSGP
KRAAPKDIYPSCKISNTCPPDIQNKIEHTTIADKILQYGS LGVFLGGLGIGTARGSGGRI
GYTPLGEGGGVRVATRPKRDSVTHIYQTCKQAGTCPPDVINKVEQTTVADNILKYGS
AGVFFGGLGISTGRGTGGATGYVPLGEGPGVRVGGTPGGSGAMVDTLSGLSSEQGQS
GDMTIEEDSATHIKFSKRDEDGKELAGATMELRDSSGKTISTWISDGQVKDFYLYPG
KYTFVETAAPDGYEVATAITFTVNEQGQVTVNGKATKGDHII

> SEQ ID NO: 2 ДНК L2(aa11-88 x5)-ggs-spycatcher

ATGAAACGTGCAAGCGCAACCCAGCTGTATAAAACCTGTAAACAGGCAGGCACC
TGTCCGCCTGATATCATTCCGAAAGTTGAAGGTAAAACCATGCGGATCAGATTC
TGCAGTATGGTAGCATGGGCGTGTTTTTGGTGGTCTGGGTATTGGCACCGGTAG
CGGCACAGGTGGACGTACCGGTTACATCCGCTGGGCACCCGTCCGCCTACCGCA
ACCGATACCCTGGCAAAACGTGCCAGCGTTACCGATCTGTACAAAACATGCAAAC
AGAGCGGAACATGTCCTCCGGATGTTGTTCTAAAGTGGAAGGCACCACCCTGGC

AGATAAAATCCTGCAGTGGTCAAGCCTGGGTATTTTCCTGGGTGGCTTAGGCATA
 GGTACAGGTAGTGGTACAGGCGGTTCGCACAGGCTATATCCCCTGGGTGGTCGTA
 GCAATACCGTTGTTGATGTTGGTCCGAAACGTGCATCAGCCACACAGCTGTATCA
 GACCTGCAAACTGACCGGTACGTGCCACCTGATGTTATCCCGAAAGTGGAAACAT
 AATACAATTGCAGACCAGATTCTGAAATGGGGTTCCTGGGCGTATTCTTCGGAG
 GCCTGGGCATCGGAACCGGTTACGGTACGGGTGGCCGTACCGGCTATGTGCCTCT
 GGGTACAAGCGCAAAACCGAGCATTACCAGCGGTCTAAACGCGCAGCACCGAA
 AGATATTTATCCGAGCTGTAAAATTAGCAATACCTGCCCTCCGGATATCCAGAAC
 AAAATTGAACATACCACCATTGCCGACAAAATCTTACGTACGGTTCTCTGGGTG
 TGTCTCTGGGAGGTTTAGGTATCGGTACGGCACGTGGTAGCGGTGGTCGCATTGG
 TTATACACCGCTGGGTGAAGGTGGTGGTGTTCGTGTTGCAACCCGTCTAAACGT
 GATAGCGTTACCCATATTTATCAGACGTGTAAACAAGCAGGTACTTGTCCACCAG
 ATGTGATTAACAAAGTGGAACAGACAACCGTTGCGGATAACATTCTGAAATATG
 GTAGTGCCGGTGTGTTTTTGGCGGACTGGGCATTTCAACCGGTCTGGTACGGG
 TGGTGCAACCGGTTACGTGCCTCTGGGCGAAGGTCCGGGTGTGCGTGTGGGTGGT
 ACACCGGGTGGTAGCGGTGCAATGGTTGATACCCTGAGCGGTCTGAGCAGCGAA
 CAGGGTCAGAGCGGTGATATGACCATTGAAGAAGATAGCGCAACCCACATCAAA
 TTCAGCAAACGTGATGAAGATGGTAAAGAACTGGCAGGCGCAACAATGGAAGT
 CGTGATAGCAGCGGTAAAACCATTAGCACCTGGATTAGTGATGGTCAGGTGAAA
 GATTTTTATCTGTACCCTGGCAAATACACCTTTGTTGAAACCGCAGCACCGGATG
 GTTATGAAGTTGCAACCGCAATTACCTTTACCGTTAATGAACAGGGCCAGGTTAC
 CGTGAATGGTAAAGCAACCAAAGGTGATGCACATATTtaa

> SEQ ID NO: 3 **Spycatcher-RO.Pf6C**

GAMVDTL SGLSSEQQSGDMTIEEDSATHIKFSKRDEDGKELAGATMELRDSSGKTIS
 TWISDGQVKDFLYPGKYTFVETAAPDGYEVATAITFTVNEQGQVTVNGKATKGDA
 HIGGSRSTSEN RNKRIGGPKLRGNVTSNIKFPSDNKGKIIIRGSNDKLNKNSDVLQSE
 KSLVSENVPSGLDIDDIPKESIFIQEDQEGQTHSELNPETSEHSKDLNNGSKNESSDIIS
 ENNKS NKVQNHFESLSDELELLENSSQDNLDKDTISTEPFPNQKHKDLQQDLNDEPLEP
 FPTQIHKDYKEKNLINEEDSEFPFRQKHKKVDNHNEEKNVFHENGSA NGNQGSLKLK
 SFDEHLKDEKIENEPLVHENLSIPNDPIEQILNQPEQETNIQEQLYNEKQNVEEKQNSQI
 PSLDLKEPTNEDILPNHNPLENIKQSESEINHVQDHALPKENIIDKLDNQKEHIDQSQH
 NINV LQENNINNHQLEPQEKPNIESFEPKNIDSEIILPENVEETEEIIDDVSPKHSNHETFE
 EETSESEHEEA VSEKNAHETVEHEETVSQESNPEKADNDGNVSQNSNNELNENEFVE

SEKSEHEARSEKKVIHGCNFSSNVSSKHTFTDSLDISLVDDSAHISCNVHLSEPKYNHL
 VGLNCPGDIIPDCFFQVYQPESEEELEPSNIVYLDQINIGDIEYYEDAEGDDKIKLFGIV
 GSIPKTTSTFCICKKDKKSAYMTVTIDSA

> SEQ ID NO: 4 ДНК Spycatcher-RO.Pf6C

GGTGCAATGGTTGATACCCTGAGCGGTCTGAGCAGCGAACAGGGTCAGAGCGGT
 GATATGACCATTGAAGAAGATAGCGCAACCCACATCAAATTCAGCAAACGTGAT
 GAAGATGGTAAAGAACTGGCAGGCGCAACAATGGAAGTGCCTGATAGCAGCGGT
 AAAACCATTAGCACCTGGATTAGTGATGGTCAGGTGAAAGATTTTTATCTGTACC
 CTGGCAAATACACCTTTGTTGAAACCGCAGCACCGGATGGTTATGAAGTTGCAAC
 CGCAATTACCTTTACCGTTAATGAACAGGGCCAGGTTACCGTGAATGGTAAAGCA
 ACCAAAGGTGATGCACATATTGGTGGTAGCAGATCCACAAGTGAGAATAGAAAT
 AAACGAATCGGGGGTCCTAAATTAAGGGGTAATGTTACAAGTAATATAAAGTTCC
 CATCAGATAACAAAGGTAAAATTATAAGAGGTTCTGAATGATAAACTTAATAAAA
 ACTCTGAAGATGTTTTAGAACAAAGCGAAAAATCGCTTGTTTCAGAAAATGTTCC
 TAGTGGATTAGATATAGATGATATCCCTAAAGAATCTATTTTTATTCAAGAAGAT
 CAAGAAGGTCAAATCATTCTGAATTAATCCTGAAACATCAGAACATAGTAAA
 GATTTAAATAATAATGGTTCAAAAAATGAATCTAGTGATATTATTTTCAGAAAATA
 ATAAATCAAATAAAGTACAAAATCATTTTGAATCATTATCAGATTTAGAAATTACT
 TGAAAAATTCCTCACAAGATAATTTAGACAAAGATACAATTTCAACAGAACCTTTT
 CCTAATCAAAAACATAAAGACTTACAACAAGATTTAAATGATGAACCTTTAGAAC
 CCTTTCCTACACAAATACATAAAGATTATAAAGAAAAAAATTTAATAAATGAAGA
 AGATTCAGAACCATTTCCAGACAAAAGCATAAAAAGGTAGACAATCATAATGA
 AGAAAAAACGTATTTTCATGAAAATGGTCTGCAAATGGTAATCAAGGAAGTTTG
 AAACCTAAATCATTCGATGAACATTTAAAGATGAAAAAATAGAAAATGAACCA
 CTTGTTTCATGAAAATTTATCCATACCAAATGATCCAATAGAACAAATATTAAATC
 AACCTGAACAAGAAACAAATATCCAGGAACAATTGTATAATGAAAAACAAATG
 TTGAAGAAAAACAAAATTCTCAAATACCTTCGTTAGATTTAAAGAACCAACAAA
 TGAAGATATTTTACCAAATCATAATCCATTAGAAAATATAAAACAAAGTGAATCA
 GAAATAAATCATGTACAAGATCATGCGCTACCAAAGAGAATATAATAGACAAA
 CTTGATAATCAAAAAGAACACATCGATCAATCACACATAATATAAATGTATTAC
 AAGAAAATAACATAAACAATCACCAATTAGAACCTCAAGAGAAACCTAATATTG
 AATCGTTTGAACCTAAAAATATAGATTAGAAAATTATTCTTCCTGAAAATGTTGA
 AACAGAAGAAATAATAGATGATGTGCCTTCCCCTAAACATTCTAACCATGAAACA

TTTGAAGAAGAAACAAGTGAATCTGAACATGAAGAAGCCGTATCTGAAAAAAAT
 GCCCACGAAACTGTGCAACATGAAGAACTGTGTCTCAAGAAAGCAATCCTGAA
 AAAGCTGATAATGATGGAAATGTATCTCAAAACAGCAACAACGAATTAATGAA
 AATGAATTCGTTGAATCGGAAAAAAGCGAGCATGAAGCAAGATCCGAAAAAAA
 GTCATACACGGATGTAACCTCTCTTCAAATGTTAGTTCTAAACATACTTTTACAGA
 TAGTTTAGATATTTCTTTAGTTGATGATAGTGCACATATTTTCATGTAACGTACATT
 TGTCTGAACCAAAATATAATCATTTGGTAGGTTTAAATTGTCCTGGTGATATTATA
 CCAGATTGCTTTTTTCAAGTATATCAACCTGAATCAGAAGAACTTGAACCATCCA
 ACATTGTTTATTTAGATTCACAAATAAATATAGGAGATATTGAATATTATGAAGA
 TGCTGAAGGAGATGATAAAATTAAATTATTTGGTATAGTTGGAAGTATACCAAAA
 ACGACATCTTTTACTTGTATATGTAAGAAGGATAAAAAAAGTGCTTATATGACAG
 TTAGTATAGATTCAGCA

> **SEQ ID NO: 5** **SpyCatcher-Pf6C**

GAMVDTL SGLSSEQQSGDMTIEEDSATHIKFSKRDEDGKELAGATMELRDSSGKTIS
 TWISDGQVKDFYLYPGKYTFVETAAPDGYEVATAITFTVNEQGQVTVNGKATKGDA
 HIGGSRSEKKVIHGCNFSNVSSKHTFTDSLDSLVDSDAHISCNVHLSEPKYNHLVGL
 NCPGDIIPDCFFQVYQPESEEEPSNIVYLDQINIGDIEYYEDAEGDDKIKLFGIVGSIP
 KTTSFTCICKKDKKSAYMTVTIDSARS

> **SEQ ID NO: 6** **ДНК SpyCatcher-Pf6C**

GGTGCAATGGTTGATACCCTGAGCGGTCTGAGCAGCGAACAGGGTCAGAGCGGT
 GATATGACCATTGAAGAAGATAGCGCAACCCACATCAAATTCAGCAAACGTGAT
 GAAGATGGTAAAGAACTGGCAGGCGCAACAATGGAAGTGCCTGATAGCAGCGGT
 AAAACCATTAGCACCTGGATTAGTGATGGTCAGGTGAAAGATTTTTATCTGTACC
 CTGGCAAATACACCTTTGTTGAAACCGCAGCACCGGATGGTTATGAAGTTGCAAC
 CGCAATTACCTTTACCGTTAATGAACAGGGCCAGGTTACCGTGAATGGTAAAGCA
 ACCAAAGGTGATGCACATATTGGTGGTAGCAGATCCGAAAAAAAAGTCATACAC
 GGATGTAACCTCTCTTCAAATGTTAGTTCTAAACATACTTTTACAGATAGTTTAGA
 TATTTCTTTAGTTGATGATAGTGCACATATTTTCATGTAAACGTACATTTGTCTGAAC
 CAAAATATAATCATTTGGTAGGTTTAAATTGTCCTGGTGATATTATACCAGATTGC
 TTTTTTCAAGTATATCAACCTGAATCAGAAGAACTTGAACCATCCAACATTGTTTA
 TTTAGATTCACAAATAAATATAGGAGATATTGAATATTATGAAGATGCTGAAGGA
 GATGATAAAATTAAATTATTTGGTATAGTTGGAAGTATACCAAAAACGACATCTT

TTACTTGTATATGTAAGAAGGATAAAAAAAGTGCTTATATGACAGTTACTATAGA
TTCAGCAAGATCT_{Taa}

> **SEQ ID NO: 7** **SpyTag-DBL1-ID2a**

MAHIVMVDAYKPTKNKIEEYLGAKSDDSKIDELLKADPSEVEYYRSGGDGDYLNKNNI
CKITVNHSDSGKYDPCEKKLPPYDDNDQWKCCQNSSDGSQKPNICVPPRRERLCTY
NLENLKFDKIRDNNAFLADVLLTARNEGEKIVQNHPTDNSSNVCNALERSFADLADII
RGTDQWKGTNSNLEKNLQMF AKIRENDKVLQDKYPKDQKYTKLREAWWNANRQ
KVWEVITCGARSNDLLIKRGWRTSGKSDRKNFELCRKCGHYEKEVPTKLDYVPQF
LRWLTEWIEDFYREKQNLIDDMERHREECTREDHKSKEGTSYCSTCKDKCKKYCEC
VKKWKTEWENQENKYKDLYEQNKNKTSQKNTSRYYDDYVKDFFEKLEANYSSLENY
IKGDPYFAEYATKLSFILNPSDANNPSGETANHNDACNCNESGISSVGQAQTSQPS
NKTCTHSSIKTNKKKECKDVKLGVRENDKDLKICVIEDTSLSGVDNCCCQDLLGILQ
ENCSDNKRGSNDSCDNKNQDECQKKLEKVFASLTNGYKCDKCKSGTSRSKWKWI
WKKSSGNEEGLQEYANTIGLPPRTQSLYLGNLPKLENVCEVDKINFDTKKFLAG
CLIVSFHEGKNLKKRYPQNKNSGNKENLCKALEYSFADYGDLIKGTSIWDNEYTKDL
ELNLQNNFGKLFQYIKKNTAEQDTSYSSLDLRESWWNTNKKYIWTAMKHGAE
MNITTCNADGSVTGSGSSCDDIPTIDLPQYLRFLQEWVENFCEQRQAKVKDVITNCK
SCKESGNCKCKTECKTKCKDECEKYKKFIEACGTAGGGIGTAGSPWSKRWDQIYKRY
SKHIEDAKRNRKAGTKNCGTSSTNAAASTDENKCVQSDIDSFFKHLIDIGLTPSSYL
SNVLDDNICGADKAPWTTYTTYTTTEKCNKERDKSKSQSSDTLVVVNVPSPLGNTPY
RYKYACQCKIPTNEETCDDRKEYMNQWSCGSARTMKRGYKNDNYELCKYNGVDV
KPTTVRSNSSKLD

> **SEQ ID NO: 8** **ДHK SpyTag-DBL1-ID2a**

atgGCTCACATCGTGATGGTGGACGCTTACAAGCCCACCAAGAACAAGATCGAGG
AATATCTGGGAGCTAAGTCCGATGACAGCAAGATCGACGAACTGCTGAAGGCCG
ATCCTAGCGAAGTGGAGTACTACAGAAGCGGAGGCGACGGCGACTACCTGAAGA
ACAACATCTGCAAGATCACCGTGAACACAGCGATAGCGGCAAGTATGACCCCT
GCGAGAAGAAGCTGCCCCCTACGACGACAACGACCAGTGGAAGTGCCAGCAGA
ACAGCAGCGACGGCAGCGGCAAGCCCGAGAACATCTGCGTGCCCCCAGACGGG
AGCGGCTGTGCACCTACAACCTGGAAAACCTGAAGTTCGACAAGATCCGGGACA
ACAACGCCTTCCTGGCCGACGTGCTGCTGACCGCCCGAACGAGGGCGAGAAGA
TCGTGCAGAACCCCGACACCAACAGCAGCAACGTGTGCAACGCCCTGGAAC

GGTCCTTCGCTGACCTGGCTGACATCATCCGGGGCACCGATCAGTGGAAGGGCAC
CAACTCCAATCTGGAAGAAAGAACCTGAAGCAGATGTTCCGCAAGATCAGAGAAAA
CGACAAGGTGCTGCAGGACAAGTACCCCAAGGACCAGAAGTACACCAAGCTGCG
GGAGGCCCTGGTGGAACGCCAACCGGCAGAAAGTGTGGGAAGTGATCACCTGTGG
CGCCAGAAGCAACGATCTGCTGATCAAGCGGGGCTGGCGGACCAGCGGCAAGAG
CGACCGGAAGAAAACTTCGAGCTGTGCCGGAAGTGCGGCCACTACGAGAAAGA
GGTGCCCAACCAAGCTGGACTACGTGCCCCAGTTCCTGCGGTGGCTGACCGAGTGG
ATCGAGGACTTCTACCGGGAGAAGCAGAACCTGATCGACGACATGGAACGGCAC
CGGGAGGAATGCACCAGAGAGGACCACAAGAGCAAAGAGGGCACCAAGCTACTG
CAGCACATGCAAGGACAAGTGCAAGAAATACTGCGAGTGCCTGAAGAAATGGAA
AACCGAGTGGGAGAACCAGGAAAAACAAGTACAAGGACCTGTACGAGCAGAACA
AGAACAAAGACCAGCCAGAAGAACACCAGCAGATACGACGACTACGTGAAGGACT
TCTTCGAGAAGCTGGAAGCCAACTACAGCAGCCTGGAAAACTACATCAAGGGCG
ACCCCTATTTTCGCTGAGTACGCTACAAAAGTGTGAGCTTCATCTGAACCCAGCGA
CGCCAAACAACCCAGCGGCGAGACAGCCAACCACAACGACGAGGCCTGCAACTG
CAACGAGAGCGGCATCAGCAGCGTGGGCCAGGCTCAGACATCCGGCCCTAGCAG
CAACAAGACCTGTATCACCCACAGCTCCATCAAGACCAACAAGAAAAAGAATG
CAAGGACGTGAAGCTGGGCGTGCAGGAGAACGACAAGGATCTGAAGATCTGCGT
GATCGAGGACACCAGCCTGAGCGGCGTGGACAAGTGTGCTGCCAGGATCTGCT
GGGCATCCTGCAGGAAAACTGCAGCGACAACAAGCGGGGCAGCAGCTCCAACGA
CAGCTGCGACAATAAGAACCAGGACGAGTGCCAGAAAAAGCTGGAAAAGGTGTT
CGCCAGCCTGACCAACGGCTACAAGTGCAGATAAGTGCAAGAGCGGCACCTCCCG
GTCCAAGAAGAAGTGGATCTGGAAGAAGTCCAGCGGCAACGAGGAAGGCCTGCA
GGAAGAGTACGCCAACACCATCGGCCTGCCCCCAGGACCCAGAGCCTGTACCT
GGGCAATCTGCCCAACTGGAAAACGTGTGCGAGGATGTGAAGGACATCAACTT
CGACACCAAAGAGAAGTTTCTGGCCGGCTGCCTGATCGTGTCTTCCACGAGGGC
AAGAATCTGAAGAAGCGCTACCCCCAGAATAAGAACAGCGGCAACAAAGAAAA
CCTGTGCAAGGCTCTGGAATACAGCTTCGCCGACTACGGCGACCTGATCAAGGGC
ACCTCCATCTGGGACAACGAGTACACAAAGGACCTGGAACTGAATCTGCAGAAC
AACTTCGGCAAGCTGTTCGGCAAGTACATCAAGAAGAACAATACCGCCGAGCAG
GACACCTCCTACAGCTCCCTGGACGAGCTGCGCGAGTCTTGGTGGAATACCAATA
AGAAGTACATCTGGACCGCCATGAAGCACGGCGCCGAGATGAACATCACCACT
GTAACGCCGACGGCTCCGTGACCGGCAGCGGCTCCAGCTGCGACGACATCCCCAC
CATCGACCTGATCCCCCAGTACCTGAGATTTCTGCAGGAATGGGTGCGAGAACTTC

TGCGAGCAGCGGCAGGCCAAAGTGAAGGACGTGATCACCAACTGCAAGAGCTGC
 AAAGAATCCGGCAACAAATGCAAGACCGAGTGCAAAACCAAGTGCAAGGATGA
 GTGCGAGAAGTACAAGAAGTTCATCGAGGCCTGCGGCACAGCCGGCGGAGGCAT
 CGGAACAGCCGGCAGCCCCCTGGTCCAAGAGATGGGACCAGATCTACAAGCGGTA
 CAGCAAGCACATCGAGGACGCCAAGCGGAACCGGAAGGCCGGCACCAAGAAGT
 GCGGCACCAAGCTCCACCACCAACGCCGCTGCCAGCACCGACGAGAATAAGTGCG
 TGCAGAGCGACATCGACAGCTTTTTCAAGCACCTGATCGATATCGGCCTGACCAC
 CCCCAGCAGCTACCTGAGCAACGTGCTGGACGACAACATCTGTGGCGCCGACAA
 GGCCCCCTGGACAACCTATACAACATACTACAACCGAGAAGTGCAACAAAGA
 GCGGGACAAGAGCAAGAGCCAGAGCAGCGACACCCTGGTGGTGGTGAACGTGCC
 CAGCCCCCTGGGCAACACACCCTACCGGTACAAGTACGCCTGCCAGTGCAAGATC
 CCCACCAACGAGGAAACATGCGACGACCGGAAAGAATACATGAACCAAGTGGTCC
 TGCGGGAGCGCTCGGACCATGAAGAGAGGGTATAAGAACGATAACTACGAAGTG
 TGCAAGTACAACGGCGTGGATGTGAAGCCCACCACCGTGCGGAGCAACTCCAGC
 AAGCTGGAC

> **SEQ ID NO: 9** **PD-L1-SpyTag**

FTITAPKDLYVVEYGSNVTMECRFPVERELDLLALVYWEKEDEQVIQFVAGEEDLK
 PQHSNFRGRASLPKDQLKGNALQITDVKLQDAGVYCCIIISYGGADYKRITLKVNA
 PYRKINQRISVDPATSEHELICQAEGYPEAEVIWTNSDHQPVSGKRSVTTSRTEGMLL
 NVTSSLRVNATANDVFYCTFWRSQPGQNHTAELIPELPAHPPQNRTHGGS AHIVM
 VDAYKPTK

> **SEQ ID NO: 10** **ДНК PD-L1-SpyTag**

TTCACCATCACCGCTCCCAAGGACCTGTACGTGGTCGAGTACGGTTCCAACGTGA
 CAATGGAATGCCGTTTCCCCGTCGAGCGCGAGCTGGACCTGTTGGCTTTGGTGGT
 GTACTGGGAGAAGGAAGATGAGCAAGTCATCCAGTTCGTGGCTGGCGAAGAGGA
 CCTGAAGCCCCAGCACTCCAAC'TCCGTGGTCGTGCTTCCCTGCCTAAGGACCAG
 CTGCTGAAGGGCAACGCTGCTCTGCAGATCACCGACGTGAAGCTGCAGGACGCT
 GGTGTCTACTGCTGCATCATCTCCTACGGTGGTGTGCTGACTACAAGCGTATCACCT
 CAAAGTGAACGCTCCCTACCGCAAGATCAACCAGCGCATCTCCGTGGACCCCGCT
 ACCTCTGAGCACGAGCTGATCTGCCAGGCTGAGGGTTACCCCGAGGCTGAAGTGA
 TCTGGACCAACTCCGACCACCAGCCCGTGTCCGGAAGCGTTCCGTGACCACCTC
 TCGTACCGAGGGCATGCTGCTGAACGTGACCTCCTCCCTGCGTGTGAACGCTACC

GCTAACGACGTGTTCTACTGCACCTTCTGGCGTTCCCAGCCCCGGCCAGAACCACA
 CCGCTGAGCTGATCATCCCCGAGCTGCCTGCTACCCACCCCCCTCAAACCGTAC
 CCACGGTGGTTCCGCTCACATCGTGATGGTGGACGCTTACAAGCCCACTAAATAA

> **SEQ ID NO: 11** **CTLA-4-spyTag**

EAIQVTQPSVVLASSHGVASFPCEYSPSHNTDEV RVTVLRQTNDQMTEVCATTFTEK
 NTVGFLDYPFCSGTFNESRVNLTIQGLRAVD TGLYLCKVELMYPPPYFVGMGNGTQI
 YVIDPEPSPSDGGS AHIVMVDAYKPTK

> **SEQ ID NO: 12** **ДНК CTLA-4-spyTag**

GAGGCTATCCAAGTGACCCAGCCCTCCGTGGTGCTGGCTTCCTCTCACGGTGTTG
 CCAGCTTCCCTTGCGAGTACTCCCCCTCCCACAACACCGACGAAGTGCGTGTGAC
 CGTGCTGCGTCAGACCAACGACCAGATGACCGAAGTGTCGCTACCACTTCACC
 GAGAAGAACACCGTCGGTTTCTTGGA CTACCCCTTCTGCTCCGGCACCTTCAACG
 AGTCCCGTGTGAACCTGACCATCCAGGGCTGCGTGCTGTGGACACCGGACTGTA
 CCTGTGCAAGGTCGAGCTGATGTACCCTCCCCCTACTTCGTGGGCATGGGCAAC
 GGCACCCAGATCTACGTGATCGACCCCGAGCCTTCCCCGACTCTGACGGTGGTT
 CTGCTCACATCGTGATGGTGGACGCTTACAAGCCCACTAAATAA

> **SEQ ID NO: 13** **AMA1-SpyTag**

QNYWEHPYQNSDVYRPINEHREHPKEYEYPLHQEHTYQQEDSGEDENTLQHAYPID
 HEGAEPAPQEQLNFSSIEIVERSNYMGNPWTEYMAKYDIEEVHSGIRVDLGEDA EV
 AGTQYRLPSGKCPVFGKGIIENSNTTFLTPVATGNQYLKDGGFAFPPTPLMSPMTLD
 EMRHFYKDNKYVKNLDELTLCSRHAGNMIPDNDKNSNYKYPVYDDKDKKCHILYI
 AAQENNGPRYCNKDESKRNSMFCFRPAKDISFQNYTYLSKNVVDNWEKVCPRKNLQ
 NAKFGLWVDGNCEDIPHVNEFPAILDFECNKLVFELSASDQPKQYEQHLTDYEKIKE
 GFKNKNASMIKSAFLPTGAFKADRYKSHGKGYNWGNYN TETQKCEIFNVKPTCLIN
 NSSYIATTALSHPIEVENNFPCSLYKDEIMKEIERESKRIKLNNDNDEGNKKIIPRIFIS
 DDKDSLKCPCDPEMVSNSTCRFFVCKCVERRAEVT SNNEVVVKEEYKDEYADIPEHK
 PTYDKMKGGSGAHIVMVDAYKPTK

> **SEQ ID NO: 14** **SpyTag-L-Der p2**

AHIVMVDAYKPTKGGSDQVDVKDCANHEIKKVLVPGCHGSEPCIIHRGKPFQLEAVF
 EANQNSKTAKIEIKASIDGLEVDVPGIDPNACHYMKCPLVKGQQYDIKYTWNVPKIA
 PKSENVVTVKVMGDDGVLACAIATHAKIRDAS

> SEQ ID NO: 15 ДНК SpyTag-L-Der p2

GCTCACATCGTGATGGTGGACGCTTACAAGCCCACCAAGGGTggatccGATCAAGTC
 GATGTCAAAGATTGTGCCAATCATGAAATCAAAAAAGTTTTGGTACCAGGATGCC
 ATGGTTCAGAACCATGTATCATTATCGTGGTAAACCATTCCAATTGGAAGCCGT
 TTTCGAAGCCAACCAAACTCAAAAACCGCTAAAATTGAAATCAAAGCTTCAATC
 GATGGTTTAGAAGTTGATGTTCCCGGTATCGATCCAAATGCATGCCATTATATGA
 AATGTCCATTGGTTAAAGGACAACAATATGATATTAAATATACATGGAATGTTCC
 GAAAATTGCACCAAAATCTGAAAATGTTGTCGTCCTGTCAAAGTTATGGGTGAT
 GATGGTGTGTTTGGCCTGTGCTATTGCTACTCATGCTAAAATCCGCGATgctagc

> SEQ ID NO: 16 miniHAstem-HIS-SpyTag

MKVKLLVLLCTFTATYADTICIGYHANNSTDVDTVLEKNVTVTHSVNLLLENGGGG
 KYVCSAKLRMVTGLRNKPSKQSQGLFGAIAAGFTGGWTGMVDGWYGYHHQNEQG
 SGYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKMNTQYTAIGCEYNKSERCMKQIEDKIEEIES
 KIWTYNAELLVLLNERTLDFHDSNVKNLYEKVKSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCN
 DECMESVKNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGVKLESMGVYQIEGHHHHHHHGGAHIV
 MVDAYKPTK

> SEQ ID NO: 17 ДНК miniHAstem-HIS-SpyTag

ATGAAAGTGAAGCTGCTGGTGCTGCTGTGCACCTTACCGCCACCTACGCCGACA
 CCATCTGCATCGGCTACCACGCCAACAACAGCACCGACACCGTGGATACCGTGCT
 GGAAAAGAACGTGACCGTGACCCACAGCGTGAACCTGCTGGAAAATGGCGGCGG
 AGGCAAATACGTGTGCAGCGCCAAGCTGCGGATGGTCACCGGCCTGAGAAACAA
 GCCCAGCAAGCAGAGCCAGGGCCTGTTCGGAGCCATTGCCGGCTTTACAGAGGG
 CGGCTGGACCGGCATGGTGGATGGGTGGTACGGCTATCACACCAGAACGAGCA
 GGGCAGCGGCTACGCCGCCGATCAGAAGTCTACCCAGAACGCCATCAACGGCAT
 CACCAACAAAGTGAACAGCGTGATCGAGAAGATGAACACCCAGTACACCGCCAT
 CGGCTGCGAGTACAACAAGAGCGAGCGGTGCATGAAGCAGATCGAGGACAAGAT
 CGAAGAGATCGAGTCTAAGATCTGGACCTACAACGCCGAAGTCTGGTGCTGCTG
 GAAAACGAGCGGACCCTGGACTTCCACGACAGCAACGTGAAGAACCTGTACGAG
 AAAGTGAAAAGCCAGCTGAAGAACAACGCCAAAGAGATCGGCAACGGCTGCTTC
 GAGTTCTACCACAAGTGCAACGACGAGTGCATGGAAAGCGTGAAGAATGGCACC
 TACGACTACCCCAAGTACAGCGAGGAAAGCAAGCTGAACCGCGAGAAGATCGAC
 GCGTGAAGCTGGAATCTATGGGCGTGTACCAGATTGAGGGCCACCACCATCACC

ATCATCACGGCGGAGCCACATCGTGATGGTGGACGCCTACAAGCCCACCAAAT
AA

> **SEQ ID NO: 18** **A1** >**SpyCatcher- Her2-ECD|23-686**

GAMVDTLSGLSSEQQSGDMTIEEDSATHIKFSKRDEDGKELAGATMELRDSSGKTIS
TWISDGQVKDFYLYPGKYTFVETAAPDGYEVATAITFTVNEQGQVTVNGKATKGDA
HIGGSTQVCTGTDMKLRLPASPETHLDMRLHLYQGCQVVQGNLELYLPTNASLSFL
QDIQEVQGYVLIAHNQVRQVPLQRLRIVRGTQLFEDNYALAVLDNGDPLNNTTPVTG
ASPGGLRELQLRSLTEILKGGVLIQRNPQLCYQDTILWKDIFHKNNQLALTIDTNRSR
ACHPCSPMCKGSRCWGESSEDCQSLTRTVCAAGGCARCKGPLPTDCCHEQCAAGCTG
PKHSDCLACLHFNHSGICELHCPALVTYNTDTFESMPNPEGRTYTFGASCVTACPYNY
LSTDVGSCTLVCPHNQEVTAEDGTQRCEKCSKPCARVCYGLGMEHLREVRVTS
NIQEFAGCKKIFGSLAFLPESFDGDPASNTAPLQPEQLQVFETLEEITGYLYISAWPDSL
PDLVSFQNLQVIRGRILHNGAYSLTLQGLGISWLGLRSLRELGSLALIHNTLHLCFV
HTVPWDQLFRNPQHALLHTANRPEDECVGEGLACHQLCARGHCWGPPTQCVNCS
QFLRGQECVEECRVLQGLPREYVNRHCLPCHPECQPQNGSVTCFGPEADQCVACA
HYKDPFPCVARCPSGVKPDLSYMPIWKFPDEEGACQPCPINCTHSCVDLDDKGCPAE
QRASPLTSIISAVVGILLVVVLGVVFGILIKRRQKIRKYTHHHHHH

> **SEQ ID NO: 19** **A2** >**SpyCatcher -IL-5(C63T/C105T)**

GAMVDTLSGLSSEQQSGDMTIEEDSATHIKFSKRDEDGKELAGATMELRDSSGKTIS
TWISDGQVKDFYLYPGKYTFVETAAPDGYEVATAITFTVNEQGQVTVNGKATKGDA
HIGGSIPTEIPTALVKETLALLSTHRTLLIANETLRIPVPVHKNHQLTTEEIFQGIGTLES
QTVQGGTVERLFKNLSLIKKYIDGQKKKTGEERRRVNQFLDYLQEFLGVMNTEWIII
S*SGRK

> **SEQ ID NO: 20** **A3** >**PCSK9|31-692|: SpyCatcher:HIS**

QEDEDGDYEELVLALRSEEDGLAEAPEHGTTATFHRCADPWRLPGTYVVVLKEET
HLSQSERTARRLQAQAARRGYLTKILHVFHGLLPGLVKMSGDLLELALKLPHVDYI
EEDSSVFAQSIPWNLERITPPRYRADEYQPPDGGSLVEVYLLDTSIQSDHREIEGRVMV
TDFENVPEEDGTRFHRQASKCDSHGTHLAGVVSGRDAGVAKGASMRSLRVLNCQG
KGTVSGTLIGLEFIRKSQVLVQPVGPLVVLLPLAGGYSRVLNAACQRLARAGVVLVTA
AGNFRDDACLYSPASAPEVITVGATNAQDQPVTLGTLGTNFGRCVDLFAPGEDIIGAS
SDCSTCFVSQSGTSQAAAHVAGIAAMMLSAEPELTLAELRQRLIHFSKDVINEAWFP

EDQRVLTPLNVAALPPSTHGAGWQLFCRTVWSAHSGPTRMATAVARCAPDEELLSC
 SSFSRSGKRRGERMEAQGGKLVCRAHNAFGGEGVYAIARCCLLPQANCSVHTAPPA
 EASMGTRVHCHQQGHVLTGCSSHWEVEDLGTHKPPVLRPGQPNQCVGHREASIHA
 SCCHAPGLECKVKEHGIPAPQEQVTVACEEGWTLTGCSALPGTSHVLGAYAVDNTC
 VVRSRDVSTTGSTSEGAVTAVAICCRSRHLAQASQELQGGSGAMVDTLSGLSSEQGQ
 SGDMTIEEDSATHIKFSKRDEDGKELAGATMELRDSSGKTISTWISDGQVKDFYLYPG
 KYTFVETAAPDGYEVATAITFTVNEQGQVTVNGKATKGDAHIHHHHHHH

> SEQ ID NO: 21 A4 > SpyCatcher -ID11D2a-HIS

GAMVDTLSGLSSEQGQSGDMTIEEDSATHIKFSKRDEDGKELAGATMELRDSSGKTIS
 TWISDGQVKDFYLYPGKYTFVETAAPDGYEVATAITFTVNEQGQVTVNGKATKGDA
 HIGGSNYIKGDPYFAEYATKLSFILNPSDANNPSGETANHNDACNCNESGISSVGQA
 QTSGPSSNKTCTHSSIKTNKKKECKDVKLGVRENDKDLKICVIEDTSLSGVDNCCCQ
 DLLGILQENCSDNKRGSNDSCDNKNQDECQKKLEKVFASLTNGYKCDKCKSGTSS
 SKKKWIWKSSGNEEGLQEEYANTIGLPPRTQSLYLGNLPKLENCEDVKDINFDTK
 EKFLAGCLIVSFHEGKNLKKRYPQNKNSGNKENLCKALEYSFADYGDLIKGTSIWDN
 EYTKDLELNLQNNFGKLFKGYIKKNNTAEQDTSYSSLDELRESWWNTNKKYIWTAM
 KHGAEMNITTCNADGSVTGSGSSCDDIPTIDLIPQYLRFLQEWVENFCEQRQAKVKD
 VITNCKSCKESGNKCKTECKTKCKDECEKYKKFIEACGTAGGGIGTAGSPWSKRWD
 QIYKRYSKHIEDAKRNRKAGTKNCGTSSTTNAASTDENKCVQSDIDSFFKHLIDIGL
 TTPSSYLSNVLDDNICGADKAPWTTYTTYTTTEKCNKERDKSKSQSSDTLVVVNVPS
 PLGNTPYRYKYACQCKIPTNEETCDDRKEYMNQWSCGSARTMKRGYKNDNYELCK
 YNGVDVKPTTVRSNSSKLDHHHHHHH

> SEQ ID NO: 22 A5 > SpyCatcher -RO-HIS

GAMVDTLSGLSSEQGQSGDMTIEEDSATHIKFSKRDEDGKELAGATMELRDSSGKTIS
 TWISDGQVKDFYLYPGKYTFVETAAPDGYEVATAITFTVNEQGQVTVNGKATKGDA
 HIGGSTSENRNKRIGGPKLRGNVTSNIKFPSDNKGKIIRGSNDKLNKNSDEVLEQSEKS
 LVSENVPSGLDIDDIPKESIFIQEDQEGQTHSELNPETSEHSKDLNNGSKNESSDIISEN
 NKSNNKVNHFESLSDLELLENSQDNLDKDTISTEPFPNQKHKDLQQDLNDEPLEPFP
 TQIHKDYKEKNLINEEDSEPFPRQKHKKVDNHNEEKNVFHENGSAANGNQGSLLKLSF
 DEHLKDEKIENEPLVHENLSIPNDPIEQILNQPEQETNIQEQLYNEKQNVEEKQNSQIPS
 LDLKEPTNEDILPNHNPLENIKQSESEINHVQDHALPKENIIDKLDNQKEHIDQSQHNI
 NVLQENNINNHQLEPQEKPNIESFEPKNIDSEIILPENVETEEIIDDVPSPKHSNHETFEE

ETSESEHEEAVSEKNAHETVEHEETVSQESNPEKADNDGNVSQNSNNELNENEFVES
 EKSEHEARSKAKEASSYDYILGWEFGGGVPEHKKEENMLSHLYVSSKDKENISKEND
 DVLDEKEEEEAEETEEEELEEKNEEETESEISEDEEEEEEEEEKEEENDKKKEQEKEQSN
 ENNDQKKDMEAQNLISKQNNNEKKNVKEAAESIMKTLAGLIKGNQIDSTLKDLEVE
 ELSKYFKNHRSHHHHHH

> SEQ ID NO: 23 A6 >HIS-RO-SpyCatcher

GSTSENRNKRIGGPKLRGNVTSNIKFPSDNKGKIIRGSNDKLNKNSDVLQSEKSLVS
 ENVPSGLDIDDIPKESIFIQEDQEGQTHSELNPETSEHSKDLNNGSKNESSDIISENNK
 SNKVQNHFESLSDELELLENSSQDNLDKDTISTEPFPNQKHKDLQQDLNDEPLEPFTQI
 HKDYKEKNLINEEDSEFPFRQKHKKVDNHNEEKNV FHENGSAANGNQGSLKLKSFDE
 HLKDEKIENEPLVHENLSIPNDPIEQILNQPEQETNIQEQLYNEKQNVEEKQNSQIPSLD
 LKEPTNEDILPNHNPLENIKQSESEINHVQDHALPKENIIDKLDNQKEHIDQSQHNINV
 LQENNINNHQLEPQEKPNIESFEPKNIDSEIILPENVEETEEIIDDVPSPKHSNHETFEETS
 ESEHEEAVSEKNAHETVEHEETVSQESNPEKADNDGNVSQNSNNELNENEFVESEKS
 EHEAGGSGAMVDTL SGLSSEQGQSGDMTIEEDSATHIKFSKRDEDGKELAGATMELR
 DSSGKTISTWISDGQVKDFYLYPGKYTFVETAAPDGYEVATAITFTVNEQGQVTVNG
 KATKGAHI

> SEQ ID NO:24 A7 >HIS-GMZ2ggsSpyCatcher

GSTSENRNKRIGGPKLRGNVTSNIKFPSDNKGKIIRGSNDKLNKNSDVLQSEKSLVS
 ENVPSGLDIDDIPKESIFIQEDQEGQTHSELNPETSEHSKDLNNGSKNESSDIISENNK
 SNKVQNHFESLSDELELLENSSQDNLDKDTISTEPFPNQKHKDLQQDLNDEPLEPFTQI
 HKDYKEKNLINEEDSEFPFRQKHKKVDNHNEEKNV FHENGSAANGNQGSLKLKSFDE
 HLKDEKIENEPLVHENLSIPNDPIEQILNQPEQETNIQEQLYNEKQNVEEKQNSQIPSLD
 LKEPTNEDILPNHNPLENIKQSESEINHVQDHALPKENIIDKLDNQKEHIDQSQHNINV
 LQENNINNHQLEPQEKPNIESFEPKNIDSEIILPENVEETEEIIDDVPSPKHSNHETFEETS
 ESEHEEAVSEKNAHETVEHEETVSQESNPEKADNDGNVSQNSNNELNENEFVESEKS
 EHEARSKAKEASSYDYILGWEFGGGVPEHKKEENMLSHLYVSSKDKENISKENDDL
 DEKEEEEAEETEEEELEEKNEEETESEISEDEEEEEEEEEKEEENDKKKEQEKEQSNENN
 DQKKDMEAQNLISKQNNNEKKNVKEAAESIMKTLAGLIKGNQIDSTLKDLEELSK
 YFKNHGGSGAMVDTL SGLSSEQGQSGDMTIEEDSATHIKFSKRDEDGKELAGATMEL
 RDSSGKTISTWISDGQVKDFYLYPGKYTFVETAAPDGYEVATAITFTVNEQGQVTVN
 GKATKGAHI

> SEQ ID NO:25 A8 >HIS-GMZ2T:ggsSpyCatcher

GSTSENRNKRIGGPKLRGNVTSNIKFPSDNKGKIIRGSNDKLNKNSDEVLEQSEKSLVS
 ENVPSGLDIDDIPKESIFIQEDQEGQTHSELNPETSEHSKDLNNGSKNESSDIISENNK
 SNKVQNHFESLSDELELSSQDNLDKDTISTEPFPNQKHKDLQQDLNDEPLEPFTQI
 HKDYKEKNLINEEDSEPFPRQKHKVDNHNEEKNVFHENGSAANGNQGSLLKLSFDE
 HLKDEKIENEPLVHENLSIPNDPIEQILNQPEQETNIQEQLYNEKQNVEEKQNSQIPSLD
 LKEPTNEDILPNHNPLENIKQSESEINHVQDHALPKENIIDKLDNQKEHIDQSQHINIV
 LQENNINNHQLEPQEKPNIESFEPKNIDSEIILPENVETEEIIDDVSPKHSNHETFEETS
 ESEHEEAVSEKNAHETVEHEETVSQESNPEKADNDGNVSQNSNNELNENEFVESEKS
 EHEARSKTKEYAEKAKNAYEKAKNAYQKANQAVLKAKEASSYDYILGWEFGGGVP
 EHKKEENMLSHLYVSSKDKENISKENDDVLDKEEEEAEETEEEELEGGSGAMVDTLS
 GLSSEQGQSGDMTIEEDSATHIKFSKRDEDGKELAGATMELRDSSGKTISTWISDGQV
 KDFYLYPGKYTFVETAAPDGYEVATAITFTVNEQGQVTVNGKATKGDAHI

> SEQ ID NO:26 A9 >SpyCatcher-PfRH5-HIS

GAMVDTLSGLSSEQGQSGDMTIEEDSATHIKFSKRDEDGKELAGATMELRDSSGKTIS
 TWISDGQVKDFYLYPGKYTFVETAAPDGYEVATAITFTVNEQGQVTVNGKATKGDA
 HIGGSLSFENAIIKTKNQENNLTLPIKSTEEKDDIKNGKDIKKEIDNDKENIKTNNA
 KDHSTYIKSYLNTNVNDGLKYLFIPIHNSFIKKYSVFNQINDGMLLNEKNDVKNNED
 YKNVDYKKNVFLQYHFKELSNYNIANSIDILQEKEGHLDFVPHYTFLDYYKHLNIN
 SIYHKYSTYGYIAVDAFIKKINETYDKVKSCKNDIKNDLIATIKKLEHPYDINNKN
 DSYRYDISEEIDDKSEETDDETEEVEDSIQDTSNHTPSNKKKNDLMNRTFKKMMDE
 YNTKKKKLIKCIKNHENDFNKICMDMKNYGTNLFEQLSCYNNNFCNTNGIRFHYDE
 YIHKLILSVKSKNLNKDLSDMTNLLQSELLLTLNLNKKMGSIYIDTIKFIHKEMKHIF
 NRIEYHTKIINDKTKIIQDKIKLNIWRTFQKDELLKRILDMSNEYSLFITSDHLRQMLYN
 TFYSKEKHLNIFHHLIYVLQMKFNDVPIKMEYFQTYKKNKPLTQHIIIIIIII

> SEQ ID NO:27 A10 >SpyCatcher-Pfs25-HIS

GAMVDTLSGLSSEQGQSGDMTIEEDSATHIKFSKRDEDGKELAGATMELRDSSGKTIS
 TWISDGQVKDFYLYPGKYTFVETAAPDGYEVATAITFTVNEQGQVTVNGKATKGDA
 HIGGSNKLYSLFLFLFIQLSIKYNNAKVTVDTVCKRGFLIQMSGHLECKCENDLVVN
 EETCEEKVLKCEKTVNKP CGDFSKCIKIDGNPVS YACKCNLGYDMVNNVCIPNECK
 NVTCGNGKCILDTSNPVKTGVCSCNIGKVPNVQDQNKCSKDGETKCSLKCLKENETC
 KAVDGIYKCDCKDGFIIIDNESSICTAFSAYNINLNSIMFILFSVCFIM

> SEQ ID NO:28 A11 >HIS-PfCSP(aa92-397)- SpyCatcher

KLKQPADGNPDPNANPNVDPNANPNVDPNANPNVDPNANPNANPNANPNANPNAN
PNANPNANPNANPNANPNANPNANPNANPNANPNANPNANPNANPNANPNANPNVDPNA
NPANPNANPNANPNANPNANPNANPNANPNANPNANPNANPNANPNANPNANPNANPN
ANPNANPNANPNANPNKNNQGNQGQGHNMPNDPNRNVDENANANS AVKNNNNEEP
SDKHIKEYLNKIQNSLSTEWSPCSVTGNGIQVRIKPGSANKPKDEL DYANDIEKKICK
MEKCSSVFNVVNSSIGLIMVLSFLFLNGGSGAMVDTLSGLSSEQGQSGDMTIEEDSAT
HIKFSKRDEDEGKELAGATMELRDSSGKTISTWISDGQVKDFYLYPGKYTFVETAAPD
GYEVATAITFTVNEQGQVTVNGKATKGDAHI

> SEQ ID NO:29 A3 >ΔHK PCSK9[31-692]:SpyCatcher:HIS

TTTCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCCGCT
GGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTAC
GTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGC
GTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTC AAGTCTCCACCCATTGACGTCAA
TGGGAGTTTGT TTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTC AAAATGTCGTAACAAC
TCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAA
GCAGAGCTCTCTGGCTAACTAGAGAACCCACTGCTTACTGGCTTATCGAAATTAA
TACGACTCACTATAGGGAGACCCAAGCTGGCTAGCGTTTAACTTAAGCTTAGCG
CAGAGGCTTGGGGCAGCCGAGCGGCAGCCAGGCCCCGGCCCGGGCCTCGGTTC
AGAAGGGAGAGGAGCCCCGCAAGGCGCGCAAGAGAGCGGGCTGCCTCGCAGTCC
GAGCCGGAGAGGGAGCGCGAGCCGCGCCGGCCCCGGACGGCTCCGAAACCATG
CAGGAAGATGAGGACGGCGACTACGAGGAACTGGTGCTGGCCCTGCGGAGCGAA
GAGGATGGACTGGCCGAGGCCCCCTGAGCACGGCACCCGCCACCTTCCACAGA
TGCGCCAAGGACCCCTTGCGGGCTGCCCCGGCACATACGTGGTGGTGCTGAAAGAG
GAAACCCACCTGAGCCAGAGCGAGCGGACCGCCAGAAGGCTGCAGGCCCAGGCC
GCCAGAAGAGGCTACCTGACCAAGATCCTGCACGTGTTCCACGGCCTGCTGCCCCG
GCTTCCTGGTGAAAATGAGCGGCGACCTGCTGGA ACTGGCCCTGAAGCTGCCCCA
CGTGGACTACATCGAAGAGGACAGCAGCGTGTTCCGCCAGAGCATCCCCTGGAA
CCTGGAACGGATCACCCCCCCCAGATACCGGGCCGACGAGTACCAGCCTCCTGAC
GGCGGCAGCCTGGTGGAAGTGACCTGCTGGACACCAGCATCCAGAGCGACCAC
CGCGAGATCGAGGGCAGAGTGATGGTGACAGACTTCGAGAACGTGCCCCAAGAG
GACGGCACCCGGTTCCACAGACAGGCCAGCAAGTGCGACAGCCACGGCACACAT
CTGGCCGGCGTGGTGCTCTGGCAGAGATGCCGGCGTGGCCAAGGGCGCCAGCATG

AGAAGCCTGCGGGTGCTGAACTGCCAGGGCAAGGGCACCGTGTCGGGCACCCTG
ATCGGCCTGGAATTCATCCGGAAGTCCCAGCTGGTGCAGCCCGTGGGCCCTCTGG
TGGTGCTGCTGCCTCTGGCTGGCGGCTACAGCAGAGTGCTGAACGCCGCCTGCCA
GAGACTGGCCAGAGCTGGCGTGGTGCTGGTGACAGCCGCCGGAACCTCCGGGA
CGACGCCTGCCTGTACAGCCCCGCCTCTGCCCCGAAGTGATCACCGTGGGCGCC
ACCAACGCCCAGGACCAGCCTGTGACACTGGGCACCCTGGGCACAACTTCGGC
AGATGCGTGGAACCTGTTCCGCCCTGGCGAGGACATCATCGGCGCCAGCAGCGACT
GCAGCACCTGTTTCGTGTCCCAGAGCGGCACCAGCCAGGCCGCTGCCCATGTGGC
CGGAATCGCCGCCATGATGCTGAGCGCCGAGCCTGAGCTGACCCTGGCCGAGCTG
CGGCAGCGGCTGATCCACTTCTCCGCCAAGGACGTGATCAACGAGGCCTGGTTCC
CCGAGGACCAGAGAGTGCTGACCCCCAACCTGGTGGCCGCCCTGCCTCCTTCTAC
ACACGGCGCTGGCTGGCAGCTGTTCTGCAGGACAGTGTTGGTCCGCCACAGCGGC
CCCACCAGAATGGCCACAGCCGTGGCCAGATGCGCCCCTGATGAGGAACTGCTG
AGCTGCAGCAGCTTCTCCAGAAGCGGCAAGCGGAGAGGCGAGCGGATGGAAGCC
CAGGGCGGCAAGCTCGTGTGCAGAGCCCACAATGCCTTCGGCGGCGAGGGCGTG
TACGCCATTGCCAGATGCTGCCTGCTGCCTCAGGCCAACTGCAGCGTGCACACAG
CCCCCTCCAGCCGAGGCCAGCATGGGCACCAGAGTGCACTGCCACCAGCAGGGCC
ACGTGCTGACCGGCTGTAGCAGCCACTGGGAGGTGGAAGATCTGGGCACCCACA
AGCCCCCGTGTGAGGCCCAGAGGCCAGCCTAATCAGTGCGTGGGCCACAGAG
AGGCCTCCATCCACGCCAGCTGTTGCCACGCCCTGGCCTGGAATGCAAAGTGAA
AGAGCACGGCATCCCTGCCCCCAGGAACAGGTCACAGTGGCCTGCGAGGAAGG
CTGGACCCTGACAGGCTGTTCCGCCCTGCCAGGCACCTCTCACGTGCTGGGCGCC
TACGCCGTGGACAATACTGCGTCGTGCGCAGCCGGGACGTGTCCACAACCGGCT
CTACAAGCGAGGGCGCCGTGACCGCCGTGGCCATCTGCTGCAGAAGCAGACACC
TGGCCCAGGCCTCCCAGGAACTGCAGGGCGGATCTGGTGCAATGGTTGATACCT
GAGCGGTCTGAGCAGCGAACAGGGTCAGAGCGGTGATATGACCATTGAAGAAGA
TAGCGCAACCCACATCAAATTCAGCAAACGTGATGAAGATGGTAAAGAACTGGC
AGGCGCAACAATGGAACCTGCGTGATAGCAGCGGTAAAACCATTAGCACCTGGAT
TAGTGATGGTCAGGTGAAAGATTTTTATCTGTACCCTGGCAAATACACCTTTGTTG
AAACCGCAGCACCGGATGGTTATGAAGTTGCAACCGCAATTACCTTTACCGTTAA
TGAACAGGGCCAGGTTACCGTGAATGGTAAAGCAACCAAAGGTGATGCACATAT
TCACCACCACCATCACCACTAAGCGGCCGCTTTT

> SEQ ID NO:30

A4

>DHK SpyCatcher-ggs-ID11D2a-HIS

GGTGCAATGGTTGATACCCTGAGCGGTCTGAGCAGCGAACAGGGTCAGAGCGGT
GATATGACCATTGAAGAAGATAGCGCAACCCACATCAAATTCAGCAAACGTGAT
GAAGATGGTAAAGAACTGGCAGGCGCAACAATGGAAGTGCCTGATAGCAGCGGT
AAAACCATTAGCACCTTTGTTGAAACCGCAGCACCGGATGGTTATGAAGTTGCAAC
CTGGCAAATACACCTTTGTTGAAACCGCAGCACCGGATGGTTATGAAGTTGCAAC
CGCAATTACCTTTACCGTTAATGAACAGGGCCAGGTTACCGTGAATGGTAAAGCA
ACCAAAGGTGATGCACATATTGGTGGTAGCGGTCCGGCAACCGAACAGGGTCAG
GATACCTTTACCAAAGTTAAAGGTGGCAGCAACTATATCAAAGGCGATCCGTATT
TTGCAGAGTATGCAACCAAAGTGAAGCTTTATTCTGAATCCGAGTGATGCAATAA
TCCGAGCGGTGAAACCGCAAATCACAATGATGAAGCCTGTAATTGTAACGAAAG
CGGTATTAGCAGCGTTGGTCAGGCACAGACCAGCGGTCCGAGCAGCAATAAAAC
CTGTATTACCCATAGCAGCATTAAACCAATAAAAAAGAAAGAAATGCAAAAGATGT
GAAACTGGGCGTGCGCGAAAATGATAAAGATCTGAAAATTTGCGTGATCGAGGA
TACCAGCCTGAGCGGTGTTGATAATTGTTGTTGTCAGGATCTGCTGGGTATTCTGC
AAGAAAATTGCAGCGATAATAAACGTGGTAGCAGCAGCAATGATAGCTGCGATA
ACAAAAATCAGGATGAATGCCAGAAAAAACTGGAAAAAGTTTTTGCCAGCCTGA
CGAATGGTTACAAATGCGATAAATGTAAAAGCGGCACCAGCCGCAGCAAAAAAGA
AATGGATTTGGAAAAAAAGCAGCGGCAATGAAGAAGGTCTGCAAGAGGAATATG
CAAATACCATTGGTCTGCCTCCGCGTACCCAGAGCCTGTATCTGGGTAATCTGCC
GAAACTGGAAAAATGTGTGTGAAGATGTGAAAGATATCAATTTTGATACCAAAGA
AAAATTTCTGGCAGGCTGCCTGATTGTGAGCTTTCATGAAGGTAAAAACCTGAAA
AAACGCTATCCGCAGAATAAAAAACAGCGGTAACAAAGAAAAATCTGTGCAAAGCA
CTGGAATACAGCTTTGCAGATTATGGCGATCTGATTAAAGGCACCAGCATTGCG
ATAACGAGTATACCAAAGATCTGGAAGTGAATCTGCAGAACAAATTTCCGTAAACT
GTTTCGGCAAATATATCAAAAAAAACAATACCGCAGAGCAGGATACCAGCTATAG
CAGCCTGGATGAACTGCGTGAAAGTTGGTGAATACCAACAAAAAATACATTTG
GACCGCCATGAAACATGGTGCCGAAATGAATATTACCACCTGTAATGCAGATGGT
AGCGTTACCGGTAGCGGTAGCAGCTGTGATGATATCCGACCATTGATCTGATTC
CGCAGTATCTGCGTTTTCTGCAAGAATGGGTTGAAAACTTTTGTGAACAGCGTCA
GGCGAAAGTGAAAGATGTTATTACCAATTGCAAAAGCTGCAAAAGAAAGCGGCAA
TAAATGCAAAACCGAGTGCAAAACCAAATGCAAAAGACGAGTGCGAGAAATACAA
AAAATTCATTGAAGCATGTGGTACAGCCGGTGGTGGTATTGGCACCGCAGGTAGC

CCGTGGTCAAAACGTTGGGATCAGATCTATAAACGCTACAGCAAACACATCGAA
 GATGCCAAACGTAATCGTAAAGCAGGCACCAAAAATTGTGGCACCAGCAGCACC
 ACCAATGCAGCAGCAAGCACCGATGAAAACAAATGTGTTTCAGAGCGATATCGAT
 AGCTTCTTCAAACATCTGATTGATATTGGTCTGACCACCCCGAGCAGCTATCTGA
 GCAATGTTCTGGATGATAACATTTGCGGTGCAGATAAAGCACCGTGGACCACCTA
 TACCACATATACCACCACAGAAAAATGCAACAAAGAGCGCGATAAAAGCAAAAG
 CCAGAGCAGCGATACCCTGGTTGTTGTTAATGTTCCGAGTCCGCTGGGTAATACC
 CCGTATCGTTATAAGTATGCCTGCCAGTGTAAAATCCCGACCAATGAAGAAACCT
 GTGATGATCGCAAAGAATACATGAATCAGTGGTCATGTGGTAGCGCACGTACCAT
 GAAACGTGGCTATAAAAACGATAATTATGAACTGTGCAAATATAACGGCGTGGA
 TGTAAACCGACCACCGTTCGTAGCAATAGCAGCAAACCTGGATCATCATCATCAC
 CATCATTAAGGATCC

> SEQ ID NO:31 A5 >DHK SpyCatcher-ggs-RO-HIS

GGTGCAATGGTTGATACCCTGAGCGGTCTGAGCAGCGAACAGGGTCAGAGCGGT
 GATATGACCATTGAAGAAGATAGCGCAACCCACATCAAATTCAGCAAACGTGAT
 GAAGATGGTAAAGAACTGGCAGGCGCAACAATGGAACGCGTGATAGCAGCGGT
 AAAACCATTAGCACCTGGATTAGTGATGGTCAGGTGAAAGATTTTTATCTGTACC
 CTGGCAAATACACCTTTGTTGAAACCGCAGCACCGGATGGTTATGAAGTTGCAAC
 CGCAATTACCTTTACCGTTAATGAACAGGGCCAGGTTACCGTGAATGGTAAAGCA
 ACCAAAGGTGATGCACATATTGGTGGTAGCACAAAGTGAGAATAGAAATAAACGA
 ATCGGGGGTCCCTAAATTAAGGGGTAATGTTACAAGTAATATAAAGTTCCCATCAG
 ATAACAAAGGTAAAATTATAAGAGGTTCTGAATGATAAACTTAATAAAAACTCTG
 AAGATGTTTTAGAACAAAGCGAAAAATCGCTTGTTTCAGAAAATGTTCTAGTGG
 ATTAGATATAGATGATATCCCTAAAGAATCTATTTTTATTCAAGAAGATCAAGAA
 GGTCAAACCTATTCTGAATTAATCCTGAAACATCAGAACATAGTAAAGATTTAA
 ATAATAATGGTTCAAAAAATGAATCTAGTGATATTATTTTCAGAAAATAATAAATC
 AAATAAAGTACAAAATCATTTTGAATCATTATCAGATTTAGAATTACTTGAAAAT
 TCCTCACAAGATAATTTAGACAAAGATACAATTTCAACAGAACCTTTTCCTAATC
 AAAAACATAAAGACTTACAACAAGATTTAAATGATGAACCTTTAGAACCCTTTCC
 TACACAAATACATAAAGATTATAAAGAAAAAAATTTAATAAATGAAGAAGATTC
 AGAACCATTTCAGACAAAAGCATAAAAAGGTAGACAATCATAATGAAGAAAA
 AAACGTATTTTCATGAAAATGGTTCTGCAAATGGTAATCAAGGAAGTTTGAACTT
 AAATCATTCGATGAACATTTAAAAGATGAAAAAATAGAAAATGAACCACTTGTTTC

ATGAAAATTTATCCATACCAAATGATCCAATAGAACAAATATTAATCAACCTGA
 ACAAGAAACAAATATCCAGGAACAATTGTATAATGAAAAACAAAATGTTGAAGA
 AAAACAAAATTCTCAAATACCTTCGTTAGATTTAAAAGAACCAACAAATGAAGAT
 ATTTTACCAAATCATAATCCATTAGAAAATATAAAACAAAGTGAATCAGAAATAA
 ATCATGTACAAGATCATGCGCTACCAAAAGAGAATATAATAGACAACTTGATA
 ATCAAAAAGAACACATCGATCAATCACACATAATATAAATGTATTACAAGAAA
 ATAACATAAACAAATCACCATTAGAACCTCAAGAGAAACCTAATATTGAATCGTT
 TGAACCTAAAAATATAGATTTCAGAAATTATTCTTCCTGAAAATGTTGAAACAGAA
 GAAATAATAGATGATGTGCCTTCCCCTAAACATTCTAACCATGAAACATTTGAAG
 AAGAAACAAGTGAATCTGAACATGAAGAAGCCGTATCTGAAAAAATGCCACG
 AAAGTGTGCAACATGAAGAACTGTGTCTCAAGAAAGCAATCCTGAAAAAGCTG
 ATAATGATGGAAATGTATCTCAAAACAGCAACAACGAATTAATGAAAATGAAT
 TCGTTGAATCGGAAAAAAGCGAGCATGAAGCAAGATCCAAAGCAAAAGAAGCTT
 CTAGTTATGATTATATTTTAGGTTGGGAATTTGGAGGAGGCGTTCCAGAACACAA
 AAAAGAAGAAAATATGTTATCACATTTATATGTTTCTTCAAAGGATAAGGAAAAT
 ATATCTAAGGAAAATGATGATGTATTAGATGAGAAGGAAGAAGAGGCAGAAGAA
 ACAGAAGAAGAAGAACTTGAAGAAAAAATGAAGAAGAAACAGAATCAGAAAT
 AAGTGAAGATGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAAGGAAGAAGAAAAT
 GACAAAAAAGAAACAAGAAAAAGAACAAAGTAATGAAAATAATGATCAAAA
 AAAAGATATGGAAGCACAGAATTTAATTTCTAAAAACCAGAATAATAATGAGAA
 AAACGTAAAAGAAGCTGCTGAAAGCATCATGAAAACTTTAGCTGGTTTAATCAA
 GGGAAATAATCAAATAGATTCTACCTTAAAAGATTTAGTAGAAGAATTATCCAAA
 TATTTTAAAAATCATAGATCTCATCACCATCATCACCATTAGggaatcctt

> SEQ ID NO:32 A6 >DHK HIS-RO-ggs-Spycatcher

GGATCCACAAGTGAGAATAGAAATAAACGAATCGGGGGTCCTAAATTAAGGGGT
 AATGTTACAAGTAATATAAAGTTCCCATCAGATAACAAAGGTAAAATTATAAGA
 GGTTCGAATGATAAACTTAATAAAAACTCTGAAGATGTTTTAGAACAAAGCGAA
 AAATCGCTTGTTTCAGAAAATGTTCCTAGTGGATTAGATATAGATGATATCCCTA
 AAGAATCTATTTTATTCAAGAAGATCAAGAAGGTCAAATCATTCTGAATTAAT
 TCCTGAAACATCAGAACATAGTAAAGATTTAAATAATAATGGTTCAAAAAATGA
 ATCTAGTGATATTATTTAGAAAATAATAAATCAAATAAAGTACAAAATCATTTT
 GAATCATTATCAGATTTAGAAATTACTTGAAAATTCCTCACAAAGATAATTTAGACA
 AAGATACAATTTCAACAGAACCTTTTCCTAATCAAAAACATAAAGACTTACAACA

AGATTTAAATGATGAACCTTTAGAACCTTTCTACACAAATACATAAAGATTAT
 AAAGAAAAAATTTAATAAATGAAGAAGATTCAGAACCATTTCAGACAAAAG
 CATAAAAAGGTAGACAATCATAATGAAGAAAAAACGTATTTTCATGAAAATGGT
 TCTGCAAATGGTAATCAAGGAAGTTTGAAACTTAAATCATTTCGATGAACATTTAA
 AAGATGAAAAAATAGAAAATGAACCACTTGTTTCATGAAAAATTTATCCATACCAA
 ATGATCCAATAGAACAAATATTAATCAACCTGAACAAGAAACAAATATCCAGG
 AACAAATTGTATAATGAAAAACAAAATGTTGAAGAAAAACAAAATTCTCAAATAC
 CTTTCGTTAGATTTAAAAGAACCAACAAATGAAGATATTTTACCAAATCATAATCC
 ATTAGAAAATATAAAACAAAGTGAATCAGAAATAAATCATGTACAAGATCATGC
 GCTACCAAAGAGAATATAATAGACAACTTGATAATCAAAAAGAACACATCGA
 TCAATCACACATAATATAAATGTATTACAAGAAAATAACATAAACAATCACCA
 ATTAGAACCTCAAGAGAAACCTAATATTGAATCGTTTGAACTAAAAATATAGAT
 TCAGAAATTATTCTTCCTGAAAATGTTGAAACAGAAGAAATAATAGATGATGTGC
 CTTCCCTAAACATTCTAACCATGAAACATTTGAAGAAGAAACAAGTGAATCTGA
 ACATGAAGAAGCCGTATCTGAAAAAATGCCCACGAACTGTGCAACATGAAGA
 AACTGTGTCTCAAGAAAGCAATCCTGAAAAAGCTGATAATGATGGAAATGTATCT
 CAAACAGCAACAACGAATTAAATGAAAATGAATTCGTTGAATCGGAAAAAAGC
 GAGCATGAAGCAGGTGGTAGCGGTGCAATGGTTGATACCCTGAGCGGTCTGAGC
 AGCGAACAGGGTCAGAGCGGTGATATGACCATTGAAGAAGATAGCGCAACCCAC
 ATCAAATTCAGCAAACGTGATGAAGATGGTAAAGAACTGGCAGGCGCAACAATG
 GAACTGCGTGATAGCAGCGGTAAAACCATTAGCACCTGGATTAGTGATGGTCAG
 GTGAAAGATTTTTATCTGTACCCTGGCAAATACACCTTTGTTGAAACCGCAGCAC
 CGGATGGTTATGAAGTTGCAACCGCAATTACCTTTACCGTTAATGAACAGGGCCA
 GGTTACCGTGAATGGTAAAGCAACCAAGGTGATGCACATATT

> SEQ ID NO: 33 A7 >HIS-GMZ2ggs-Spycatcher

GGATCCACAAGTGAGAATAGAAATAAACGAATCGGGGGTCCTAAATTAAGGGGT
 AATGTTACAAGTAATATAAAGTTCCCATCAGATAACAAAGGTAAAATTATAAGA
 GGTTTCGAATGATAAACTTAATAAAAACTCTGAAGATGTTTTAGAACAAAGCGAA
 AAATCGCTTGTTTCAGAAAATGTTCTAGTGGATTAGATATAGATGATATCCCTA
 AAGAATCTATTTTATTCAAGAAGATCAAGAAGGTCAAACCTATTCTGAATTTAA
 TCCTGAAACATCAGAACATAGTAAAGATTTAAATAATAATGGTTCAAAAAATGA
 ATCTAGTGATATTATTTAGAAAATAATAAATCAAATAAAGTACAAAATCATTTT
 GAATCATTATCAGATTTAGAATTACTTGAAAATTCCTCACAAAGATAATTTAGACA

AAGATACAATTTCAACAGAACCTTTTCCTAATCAAAAACATAAAGACTTACAACA
AGATTTAAATGATGAACCTTTAGAACCTTTTCCTACACAAATACATAAAGATTAT
AAAGAAAAAATTTAATAAATGAAGAAGATTCAGAACCATTTCCCAGACAAAAG
CATAAAAAGGTAGACAATCATAATGAAGAAAAAACGTATTTTCATGAAAATGGT
TCTGCAAATGGTAATCAAGGAAGTTTGAAACTTAAATCATTTCGATGAACATTTAA
AAGATGAAAAAATAGAAAATGAACCACTTGTTTCATGAAAAATTTATCCATACCAA
ATGATCCAATAGAACAAATATTAATCAACCTGAACAAGAAACAAATATCCAGG
AACAAATTGTATAATGAAAAACAAATGTTGAAGAAAAACAAAATTCTCAAATAC
CTTCGTTAGATTTAAAAGAACCAACAAATGAAGATATTTTACCAAATCATAATCC
ATTAGAAAATATAAAACAAAGTGAATCAGAAATAAATCATGTACAAGATCATGC
GCTACCAAAAAGAGAATATAATAGACAACTTGATAATCAAAAAGAACACATCGA
TCAATCACAAACATAATATAAATGTATTACAAGAAAATAACATAAAACAATCACCA
ATTAGAACCTCAAGAGAAACCTAATATTGAATCGTTTGAACCTAAAAATATAGAT
TCAGAAATTATTCCTTCTGAAAATGTTGAAACAGAAAGAAATAATAGATGATGTGC
CTTCCCTAAACATTCTAACCATGAAACATTTGAAGAAGAAACAAGTGAATCTGA
ACATGAAGAAGCCGTATCTGAAAAAATGCCACGAACTGTGCAACATGAAGA
AACTGTGTCTCAAGAAAGCAATCCTGAAAAAGCTGATAATGATGGAAATGTATCT
CAAAACAGCAACAACGAATTAAATGAAAATGAATTCGTTGAATCGGAAAAAAGC
GAGCATGAAGCAAGATCCAAAGCAAAAGAAGCTTCTAGTTATGATTATATTTTAG
GTTGGGAATTTGGAGGAGGCGTTCCAGAACACAAAAAAGAAGAAAATATGTTAT
CACATTTATATGTTTCTTCAAAGGATAAGGAAAAATATATCTAAGGAAAATGATGA
TGTATTAGATGAGAAGGAAGAAGAGGCAGAAGAAACAGAAGAAGAAGAACTTG
AAGAAAAAATGAAGAAGAAACAGAATCAGAAATAAGTGAAGATGAAGAAGAA
GAAGAAGAAGAAGAAGAAAAGGAAGAAGAAAATGACAAAAAAGAACAAG
AAAAAGAACAAGTAATGAAAATAATGATCAAAAAAAGATATGGAAGCACAG
AATTTAATTTCTAAAAACCAGAATAATAATGAGAAAAACGTAAAAGAAGCTGCT
GAAAGCATCATGAAAACTTTAGCTGGTTTAATCAAGGGAAATAATCAAATAGATT
CTACCTTAAAAGATTTAGTAGAAGATTATCCAAATATTTTAAAAATCATGGTGG
TAGCGGTGCAATGGTTGATACCCTGAGCGGTCTGAGCAGCGAACAGGGTCAGAG
CGGTGATATGACCATTGAAGAAGATAGCGCAACCCACATCAAATTCAGCAAACG
TGATGAAGATGGTAAAGAACTGGCAGGCGCAACAATGGAAGTGCATGATAGCAG
CGGTAAAACCATTAGCACCTGGATTAGTGATGGTCAGGTGAAAGATTTTTATCTG
TACCCTGGCAAATACACCTTTGTTGAAACCGCAGCACCGGATGGTTATGAAGTTG

CAACCGCAATTACCTTTACCGTTAATGAACAGGGCCAGGTTACCGTGAATGGTAA
AGCAACCAAAGGTGATGCACATATT

> SEQ ID NO:34 A8 >ДHK HIS-GMZ2T:ggs-Spycatcher

GGATCCACAAGTGAGAATAGAAATAAACGAATCGGGGGTCCTAAATTAAGGGGT
AATGTTACAAGTAATATAAAGTTCCCATCAGATAACAAAGGTAAAATTATAAGA
GGTTCGAATGATAAACTTAATAAAAACTCTGAAGATGTTTTAGAACAAAGCGAA
AAATCGCTTGTTTCAGAAAATGTTCCCTAGTGGATTAGATATAGATGATATCCCTA
AAGAATCTATTTTATTCAAGAAGATCAAGAAGGTCAAACCTATTCTGAATTAA
TCCTGAAACATCAGAACATAGTAAAGATTTAAATAATAATGGTTCAAAAAATGA
ATCTAGTGATATTATTTTCAGAAAATAATAAATCAAATAAAGTACAAAATCATT
GAATCATTATCAGATTTAGAACTTGTGAAAATTCCTCACAAAGATAATTTAGACA
AAGATACAATTTCAACAGAACCTTTTCCTAATCAAAAACATAAAGACTTACAACA
AGATTTAAATGATGAACCTTTAGAACCTTTTCCTACACAAATACATAAAGATTAT
AAAGAAAAAAATTTAATAAATGAAGAAGATTCAGAACCATTTCCCAGACAAAAG
CATAAAAAGGTAGACAATCATAATGAAGAAAAAAACGTATTTTCATGAAAATGGT
TCTGCAAATGGTAATCAAGGAAGTTTGAAACTTAAATCATTTCGATGAACATTTAA
AAGATGAAAAAATAGAAAATGAACCACTTGTTTCATGAAAATTTATCCATACCAA
ATGATCCAATAGAACAAATATTAATCAACCTGAACAAGAAACAAATATCCAGG
AACAAATTGTATAATGAAAAACAAAATGTTGAAGAAAAACAAAATTTCTCAAAATAC
CTTCGTTAGATTTAAAAAGAACCAACAAATGAAGATATTTTACCAATCATAATCC
ATTAGAAAATATAAAACAAAGTGAATCAGAAATAAATCATGTACAAGATCATGC
GCTACCAAAAGAGAATATAATAGACAACTTGATAATCAAAAAGAACACATCGA
TCAATCACACATAATATAAATGTATTACAAGAAAATAACATAAACAATCACCA
ATTAGAACCTCAAGAGAAACCTAATATTGAATCGTTTGAACCTAAAAATATAGAT
TCAGAAATTATTCTTCCTGAAAATGTTGAAACAGAAGAAATAATAGATGATGTGC
CTTCCCCTAAACATTCTAACCATGAAACATTTGAAGAAGAAACAAGTGAATCTGA
ACATGAAGAAGCCGTATCTGAAAAAAATGCCCACGAAACTGTGGAACATGAAGA
AACTGTGTCTCAAGAAAGCAATCCTGAAAAAGCTGATAATGATGGAAATGTATCT
CAAAACAGCAACAACGAATTAAATGAAAATGAATTCGTTGAATCGGAAAAAAGC
GAGCATGAAGCAAGATCCAAAACAAAAGAATATGCTGAAAAAGCAAAAAATGCT
TATGAAAAGGCAAAAAATGCTTATCAAAAAGCAAACCAAGCTGTTTTAAAGCA
AAAGAAGCTTCTAGTTATGATTATTTTTAGGTTGGGAATTTGGAGGAGGCGTTC
CAGAACACAAAAAGAAAGAAATATGTTATCACATTTATATGTTTCTTCAAAGGA

TAAGGAAAATATATCTAAGGAAAATGATGATGTATTAGATGAGAAGGAAGAAGA
 GGCAGAAGAAACAGAAGAAGAAGAACTTGAAGGTGGTAGCGGTGCAATGGTTG
 ATACCCTGAGCGGTCTGAGCAGCGAACAGGGTCAGAGCGGTGATATGACCATTG
 AAGAAGATAGCGCAACCCACATCAAATTCAGCAAACGTGATGAAGATGGTAAAG
 AACTGGCAGGCGCAACAATGGAAGTGCCTGATAGCAGCGGTAAAACCATAGCA
 CCTGGATTAGTGATGGTCAGGTGAAAGATTTTTATCTGTACCCTGGCAAATACAC
 CTTTGTGAAACCGCAGCACCGGATGGTTATGAAGTTGCAACCGCAATTACCTTT
 ACCGTTAATGAACAGGGCCAGGTTACCGTGAATGGTAAAGCAACCAAAGGTGAT
 GCACATATT

> SEQ ID NO:35 A9 >ДHK Spycatcher-ggs-PfRH5-HIS

GGTGCAATGGTTGATACCCTGAGCGGTCTGAGCAGCGAACAGGGTCAGAGCGGT
 GATATGACCATTGAAGAAGATAGCGCAACCCACATCAAATTCAGCAAACGTGAT
 GAAGATGGTAAAGAACTGGCAGGCGCAACAATGGAAGTGCCTGATAGCAGCGGT
 AAAACCATTAGCACCTGGATTAGTGATGGTCAGGTGAAAGATTTTTATCTGTACC
 CTGGCAAATACACCTTTGTTGAAACCGCAGCACCGGATGGTTATGAAGTTGCAAC
 CGCAATTACCTTTACCGTTAATGAACAGGGCCAGGTTACCGTGAATGGTAAAGCA
 ACCAAAGGTGATGCACATATTGGTGGTAGCCTGTCTTCGAGAACGCCATCAAGA
 AGACCAAGAACCAGGAAAACAACCTGACCCTGCTGCCCATCAAGTCCACCGAGG
 AAGAGAAGGACGACATCAAGAACGGCAAGGATATCAAGAAGGAAATCGACAAC
 GACAAGGAAAACATCAAGACCAACAACGCCAAGGACCACTCCACCTACATCAAG
 TCTTACCTGAACACCAACGTGAACGACGGCCTGAAGTACCTGTTTCATCCCATCCC
 ACAACAGCTTCATCAAGAAGTACTCCGTTTTCAACCAGATCAACGACGGCATGCT
 GCTGAACGAGAAGAACGACGTGAAGAACAACGAGGACTACAAGAACGTCGACT
 ACAAGAACGTGAACTTCCTGCAGTACCCTTCAAGGAAGTGTCCAACCTACAACAT
 CGCCAACTCCATCGACATCCTGCAAGAAAAGGAAGGCCACCTGGACTTCGTGATC
 ATCCCCCACTACACTTTCTTGACTACTACAAGCACCTGTCCTACAACAGCATCTA
 CCACAAGTACAGCACCTACGGCAAGTACATCGCTGTGGACGCTTTCATCAAGAAG
 ATCAACGAGACTTACGACAAAGTGAAGTCCAAGTGTAAACGATATCAAGAACGAC
 CTGATCGCCACCATCAAGAAGCTCGAGCACCCCTACGACATCAACAACAAGAAC
 GACGACAGCTACCGCTACGACATCTCCGAAGAGATCGACGACAAGTCCGAGGAA
 ACCGACGACGAGACTGAGGAAGTCGAGGACTCCATCCAGGACACCGACTCCAAC
 CACACCCCCTCCAACAAGAAGAAGAACGATCTGATGAACCGCACCTTCAAGAAG
 ATGATGGACGAGTACAACACTAAGAAGAAGAAGCTGATCAAGTGCATCAAGAAC

CACGAGAACGACTTCAACAAGATCTGCATGGACATGAAGAACTACGGCACCAAC
 CTGTTTCGAGCAGCTGTCCTGCTACAACAACAACCTTCTGCAACACTAACGGCATCC
 GCTTCCACTACGATGAGTACATCCACAAGCTGATCCTGTCCGTCAAGAGCAAGAA
 CCTGAACAAGGACCTGAGCGACATGACCAACATCCTCCAGCAGTCCGAGCTGCTG
 CTGACCAACTTGAACAAGAAGATGGGCTCCTACATCTACATCGACACTATCAAGT
 TCATCCACAAGGAAATGAAGCACATCTTCAACCGCATCGAGTACCACACCAAGAT
 CATCAACGATAAGACTAAGATCATCCAAGACAAGATCAAGCTGAACATCTGGCG
 CACTTTCCAAAAGGACGAACTGCTGAAGCGTATCCTGGACATGTCTAACGAGTAC
 TCCCTCTTCATCACCTCCGACCACCTGAGGCAGATGCTGTACAACACCTTCTACTC
 CAAGGAAAAGCACCTCAACAACATCTTCCACCACCTGATCTACGTGCTGCAGATG
 AAGTTCAACGACGTCCCATCAAGATGGAATACTTCCAGACCTACAAGAAGAAC
 AAGCCCCTGACCCAGCATCATCACCACCACCAC

> SEQ ID NO: 36 (последовательность SpyTag)

AHIVMVDAYKPTK

> SEQ ID NO: 37 SpyCatcher

GAMVDTLSGLSSEQGQSGDMTIEEDSATHIKFSKRDEDGKELAGATMELRDSSGKTIS
 TWISDGQVKDFLYPGKYTFVETAAPDGYEVATAITFTVNEQGQVTVNGKATKGDA
 HI

> SEQ ID NO: 38 β -нить CnaB2 (KTag)

ATHIKFSKRD

> SEQ ID NO: 39 Последовательность ДНК SpyTag

GCTCACATCGTGATGGTGGACGCTTACAAGCCCACCAAG

> SEQ ID NO: 40 >Сурвивин:ggs-Spycatcher (Homo Sapiens)

MGAPTLPPAWQPFLKDHRISTFKNWPFLGCACTPERMAEAGFIHCPTENEPDLAQCF
 FCFKELEGWEPDDDDPIEEHKKHSSGCAFLSVKKQFEELTLGEFLKLDREERAKNKIAKE
 TNNKKKEFEETAKKVRRAIEQLAAMDggsGAMVDTLSGLSSEQGQSGDMTIEEDSAT
 HIKFSKRDEDGKELAGATMELRDSSGKTISTWISDGQVKDFLYPGKYTFVETAAPD
 GYEVATAITFTVNEQGQVTVNGKATKGDAHI

> SEQ ID NO: 41 > Spycatcher-ggs-сурвивин (Homo Sapiens)

GAMVDTL SGLSSEQGQSGDMTIEEDSATHIKFSKRDEDGKELAGATMELRDSSGKTIS
 TWISDGQVKDFYLYPGKYTFVETAAPDGYEVATAITFTVNEQGQVTVNGKATKGDA
 HIggsGAPTLPPAWQPFLKDHRISTFKNWPFLGCACTPERMAEAGFIHCPTENEPDLA
 QCFFCFKELEGWEPDDDDPIEEHKKHSSGCAFLSVKKQFEELTLGEFLKDRERAKNKI
 AKETNNKKKEFEETAKKVRRAIEQLAAMD

> SEQ ID NO: 42 > Сурвивин(F101A/L102A)-ggs-Spycatcher (Homo Sapiens)

MGAPTLPPAWQPFLKDHRISTFKNWPFLGCACTPERMAEAGFIHCPTENEPDLAQCF
 FCKELEGWEPDDDDPIEEHKKHSSGCAFLSVKKQFEELTLGEAAKDRERAKNKIAK
 ETNNKKKEFEETAKKVRRAIEQLAAMDggsGAMVDTL SGLSSEQGQSGDMTIEEDSA
 THIKFSKRDEDGKELAGATMELRDSSGKTISTWISDGQVKDFYLYPGKYTFVETAAP
 DGYEVATAITFTVNEQGQVTVNGKATKGDAHI

> SEQ ID NO: 43 > Spycatcher-ggs-сурвивин(F101A/L102A) (Homo Sapiens)

GAMVDTL SGLSSEQGQSGDMTIEEDSATHIKFSKRDEDGKELAGATMELRDSSGKTIS
 TWISDGQVKDFYLYPGKYTFVETAAPDGYEVATAITFTVNEQGQVTVNGKATKGDA
 HIggsGAPTLPPAWQPFLKDHRISTFKNWPFLGCACTPERMAEAGFIHCPTENEPDLA
 QCFFCFKELEGWEPDDDDPIEEHKKHSSGCAFLSVKKQFEELTLGEAAKDRERAKNKI
 AKETNNKKKEFEETAKKVRRAIEQLAAMD

> SEQ ID NO: 44 > Spycatcher-ggs-сурвивин(F101A/L102A) (Mus Musculus)

GAMVDTL SGLSSEQGQSGDMTIEEDSATHIKFSKRDEDGKELAGATMELRDSSGKTIS
 TWISDGQVKDFYLYPGKYTFVETAAPDGYEVATAITFTVNEQGQVTVNGKATKGDA
 HIGGSGAPALPQIWQLYLKNYRIATFKNWPFLGCACTPERMAEAGFIHCPTENEPDL
 AQFFCFKELEGWEPDDNPIEEHRKHSPGCAFLTVKKQMEELTVSEAAKDRQRAKN
 KIAKETNNKQKEFEETAKTTRQSIEQLAASGRF

> SEQ ID NO: 45 > Сурвивин (F101A/L102A)-ggs-Spycatcher (Mus Musculus)

GAPALPQIWQLYLKNYRIATFKNWPFLGCACTPERMAEAGFIHCPTENEPDLAQCF
 CFKELEGWEPDDNPIEEHRKHSPGCAFLTVKKQMEELTVSEAAKDRQRAKNKIAKE
 TNNKQKEFEETAKTTRQSIEQLAaggsgGAMVDTL SGLSSEQGQSGDMTIEEDSATHIKF
 SKRDEDGKELAGATMELRDSSGKTISTWISDGQVKDFYLYPGKYTFVETAAPDGYEV
 ATAITFTVNEQGQVTVNGKATKGDAHI

> SEQ ID NO: 46 > Spycatcher-ggs-сурвивин (Mus Musculus)

GAMVDTLSGLSSEQGQSGDMTIEEDSATHIKFSKRDEDGKELAGATMELRDSSGKTIS
 TWISDGQVKDFYLYPGKYTFVETAAPDGYEVATAITFTVNEQGQVTVNGKATKGD
 HIGGSGAPALPQIWQLYLKKNYRIATFKNWPFLLEDCACTPERMAEAGFIHCPTENEPDL
 AQCFFCFKELEGWEPDDNPIEHRKHSPGCAFLTVKKQMEELTVSEFLKLDQRQAKN
 KIAKETNNKQKEFEETAKTTROSIEQLAASGRF

> SEQ ID NO: 47 > Сурвивин-ggs-Spycatcher (Mus Musculus)

GAPALPQIWQLYLKKNYRIATFKNWPFLLEDCACTPERMAEAGFIHCPTENEPDLAQCFF
 CFKELEGWEPDDNPIEHRKHSPGCAFLTVKKQMEELTVSEFLKLDQRQAKNKIAKE
 TNNKQKEFEETAKTTROSIEQLAAGGSGAMVDTLSGLSSEQGQSGDMTIEEDSATHIK
 FSKRDEDGKELAGATMELRDSSGKTISTWISDGQVKDFYLYPGKYTFVETAAPDGYE
 VATAITFTVNEQGQVTVNGKATKGDANI

> SEQ ID NO: 48 > ДНК Spycatcher-ggs-сурвивин(F101A/L102A) (Mus Musculus)

GGTGCAATGGTTGATACCTGAGCGGTCTGAGCAGCGAACAGGGTCAGAGCGGT
 GATATGACCATTGAAGAAGATAGCGCAACCCACATCAAATTCAGCAAACGTGAT
 GAAGATGGTAAAGAACTGGCAGGCGCAACAATGGAACGCGTGATAGCAGCGGT
 AAAACCATTAGCACCTGGATTAGTGATGGTCAGGTGAAAGATTTTTATCTGTACC
 CTGGCAAATACACCTTTGTTGAAACCGCAGCACCGGATGGTTATGAAGTTGCAAC
 CGCAATTACCTTTACCGTTAATGAACAGGGCCAGGTACCCTGAATGGTAAAGCA
 ACCAAAGGTGATGCACATATTGGTGGTAGCGGTGCACCGGCACTGCCGCAGATTT
 GGCAGCTGTATCTGAAAACTATCGTATCGCCACCTTTAAAACTGGCCGTTTCT
 GGAAGATTGTGCATGTACACCGGAACGTATGGCAGAAGCAGGTTTTATTATTGT
 CCGACCGAAAATGAACCGGATCTGGCACAGTGTTTTTTTGTCTTAAAGAACTGG
 AAGGTTGGGAGCCGGATGATAATCCGATTGAAGAACATCGTAAACATAGTCCGG
 GTTGTGCATTTCTGACCGTGAAAAACAAATGGAAGAACTGACCGTTAGCGAGG
 CAGCAAACTGGATCGTCAGCGTGCCAAAAACAAAATTGCAAAAGAAACCAATA
 ACAAACAGAAAGAATTGCAAGAAACCGCCAAAACACCCGTCAGAGCATTGAAC
 AGCTGGCAGCAagcgccgcttt

> SEQ ID NO: 49 >ДНК сурвивин (F101A/L102A)-ggs-Spycatcher (Mus Musculus)

GGTGCAACCGGCACTGCCGCAGATTTGGCAGCTGTATCTGAAAACTATCGTATCG
CCACCTTTAAAACTGGCCGTTTCTGGAAGATTGTGCATGTACACCGGAACGTAT
GGCAGAAGCAGGTTTTATTTCATTGTCCGACCGAAAAATGAACCGGATCTGGCACAG
TGTTTTTTTTGCTTTAAAGAACTGGAAGGTGGGAGCCGGATGATAATCCGATTG
AAGAACATCGTAAACATAGTCCGGGTGTGCATTTCTGACCGTGAAAAAACAAAT
GGAAGAACTGACCGTTAGCGAGGCAGCAAACTGGATCGTCAGCGTGCCAAAAA
CAAAATTGCAAAAGAAACCAATAACAAACAGAAAGAATTCTGAAGAAACCGCCA
AAACCACCCGTCAGAGCATTGAACAGCTGGCAGCAGGTGGCAGCGGTGCAATGG
TTGATACCCTGAGCGGTCTGAGCAGCGAACAGGGTCAGAGCGGTGATATGACCA
TTGAAGAAGATAGCGCAACCCACATCAAATTCAGCAAACGTGATGAAGATGGTA
AAGAACTGGCAGGCGCAACAATGGAAGTGCCTGATAGCAGCGGTAACCATTA
GCACCTGGATTAGTGATGGTCAGGTGAAAGATTTTTATCTGTACCCTGGCAAATA
CACCTTTGTTGAAACCGCAGCACCGGATGGTTATGAAGTTGCAACCGCAATTACC
TTTACCGTTAATGAACAGGGCCAGGTTACCGTGAATGGTAAAGCAACCAAAGGT
GATGCACATATT

> SEQ ID NO: 50 > ДНК Spycatcher-ggs-сурвивин (Mus Musculus)

GGTGCAATGGTTGATACCCTGAGCGGTCTGAGCAGCGAACAGGGTCAGAGCGGT
GATATGACCATTGAAGAAGATAGCGCAACCCACATCAAATTCAGCAAACGTGAT
GAAGATGGTAAAGAACTGGCAGGCGCAACAATGGAAGTGCCTGATAGCAGCGGT
AAACCATTAGCACCTGGATTAGTGATGGTCAGGTGAAAGATTTTTATCTGTACC
CTGGCAAATACACCTTTGTTGAAACCGCAGCACCGGATGGTTATGAAGTTGCAAC
CGCAATTACCTTTACCGTTAATGAACAGGGCCAGGTTACCGTGAATGGTAAAGCA
ACCAAAGGTGATGCACATATTGGTGGTAGCGGTGCACCGGCACTGCCGCAGATTT
GGCAGCTGTATCTGAAAACTATCGTATCGCCACCTTTAAAACTGGCCGTTTCT
GGAAGATTGTGCATGTACACCGGAACGTATGGCAGAAGCAGGTTTTATTTCATTGT
CCGACCGAAAAATGAACCGGATCTGGCACAGTGTTTTTTTTGCTTTAAAGAACTGG
AAGGTTGGGAGCCGGATGATAATCCGATTGAAGAACATCGTAAACATAGTCCGG
GTTGTGCATTTCTGACCGTGAAAAAACAAATGGAAGAACTGACCGTTAGCGAGTT
TCTGAAACTGGATCGTCAGCGTGCCAAAAACAAATTGCAAAAGAAACCAATAA
CAAACAGAAAGAATTCTGAAGAAACCGCCAAAACACCCGTCAGAGCATTGAACA
GCTGGCAGCAagcgccgcttt

> SEQ ID NO: 51 >ДНК сурвивин-ggs-Spycatcher (Mus Musculus)

GGTGCAACCGGCACTGCCGCAGATTTGGCAGCTGTATCTGAAAACTATCGTATCG
 CCACCTTTAAAACTGGCCGTTTCTGGAAGATTGTGCATGTACACCGGAACGTAT
 GGCAGAAGCAGGTTTTATTTCATTGTCCGACCGAAAATGAACCGGATCTGGCACAG
 TGTTTTTTTTGCTTTAAAGAACTGGAAGGTTGGGAGCCGGATGATAATCCGATTG
 AAGAACATCGTAAACATAGTCCGGGTTGTGCATTTCTGACCGTGAAAAAACAAAT
 GGAAGAACTGACCGTTAGCGAGTTTCTGAACTGGATCGTCAGCGTGCCAAAAA
 CAAAATTGCAAAAGAAACCAATAACAAACAGAAAGAATTCTGAAGAAACCGCCA
 AAACCACCCGTCAGAGCATTGAACAGCTGGCAGCAGGTGGCAGCGGTGCAATGG
 TTGATACCCTGAGCGGTCTGAGCAGCGAACAGGGTCAGAGCGGTGATATGACCA
 TTGAAGAAGATAGCGCAACCCACATCAAATTCAGCAAACGTGATGAAGATGGTA
 AAGAACTGGCAGGCGCAACAATGGAAGTGCCTGATAGCAGCGGTAAAACCATTA
 GCACCTGGATTAGTGATGGTCAGGTGAAAGATTTTATCTGTACCCCTGGCAAATA
 CACCTTTGTTGAAACCGCAGCACCGGATGGTTATGAAGTTGCAACCGCAATTACC
 TTTACCGTTAATGAACAGGGCCAGGTTACCGTGAATGGTAAAGCAACCAAAGGT
 GATGCACATATT

> SEQ ID NO: 52 >Белок Spycatcher-ggs-CIDR1a-HIS

GAMVDTLSEGLSSEQGSGDMTIEEDSATHIKFSKRDEDGKELAGATMELRDSSGKTIS
 TWISDGQVKDFLYPGKYTFVETAAPDGYEVATAITFTVNEQGQVTVNGKATKGDA
 HIGGSKITSFDEFFDFWVRKLLIDTIKWETELTYCINNTDVTDCNKCNCNCVCFDKWV
 KQKEDEWTNIMKLFTNKHDIPKKYYLNINDLFDSFFFQVIYKFNEGEAKWNELKENL
 KKQIASSKANNGTKDSEAAIKVLFNHIKEIATICKDNNTN

> SEQ ID NO: 53 >ДНК Spycatcher-ggs-CIDR1a-HIS

GGTGCAATGGTTGATACCCTGAGCGGTCTGAGCAGCGAACAGGGTCAGAGCGGT
 GATATGACCATTGAAGAAGATAGCGCAACCCACATCAAATTCAGCAAACGTGAT
 GAAGATGGTAAAGAAC'IGGCAGGCGCAACAA'IGGAAC'IGCGT'GATAGCAGCGGT
 AAAACCATTAGCACCTTGATTAGTGATGGTCAGGTGAAAGATTTTATCTGTACC
 CTGGCAAATACACCTTTGTTGAAACCGCAGCACCGGATGGTTATGAAGTTGCAAC
 CGCAATTACCTTTACCGTTAATGAACAGGGCCAGGTTACCGTGAATGGTAAAGCA
 ACCAAAGGTGATGCACATATTGGTGGTAGCAAATAACGTCATTTGATGAATTTT
 TTGATTTTTGGGTTAGAAAATTATTAATAGACACTATAAAGTGGGAAACCGAACT
 TACGTATTGTATAAATAATACTGATGTACCGATTGTAATAAATGTAACAAAAAT

TGCGTATGTTTTGACAAATGGGTAAACAAAAAGAAGACGAATGGACAAATATA
 ATGAAACTATTCACAAACAAACACGATATACCGAAAAATATTATCTTAATATTA
 ATGATCTTTTTGATAGTTTTTTTTTCCAAGTTATATATAAGTTTAACGAAGGAGAA
 GCAAAATGGAATGAACTTAAAGAAAATTTAAAAAGCAAATTGCGTCTTCCAAA
 GCAAATAACGGAACCAAAGATTCAGAAGCTGCAATAAAAGTGTTGTTAATCAC
 ATAAAAGAAATTGCAACAATATGCAAAGATAATAATACAAAC

> **SEQ ID NO: 54** > **SpyCatcher**

GGTGAATGGTTGATACCCTGAGCGGTCTGAGCAGCGAACAGGGTCAGAGCGGT
 GATATGACCATTGAAGAAGATAGCGCAACCCACATCAAATTCAGCAAACGTGAT
 GAAGATGGTAAAGAAGTGGCAGGCGCAACAATGGAAGTGCCTGATAGCAGCGGT
 AAAACCATTAGCACCTGGATTAGTGATGGTCAGGTGAAAGATTTTATCTGTACC
 CTGGCAAATACACCTTTGTTGAAACCGCAGCACCGGATGGTTATGAAGTTGCAAC
 CGCAATTACCTTTACCGTTAATGAACAGGGCCAGGTTACCGTGAATGGTAAAGCA
 ACCAAAGGTGATGCACATATT

> **SEQ ID NO: 55** **SpyLigase:**

HHHHHHHDYDGQSGDGKELAGATMELRDSSGKTISTWISDGQVKDFLYPGKYTFVE
 TAAPDGYEVATAITFTVNEQQQVTVNGKATKGGSGSGSGSGEDSATHI

> **SEQ ID NO: 56** **Изопептид Spy0128**

TDKDMTITFTNKKDAE

> **SEQ ID NO: 57** **Split-Spy0128**

ATTVHGETVVNGAKLTVTKNLDLVNSNALIPNTDFTFKIEPDTTVNEDGNKFKGV AL
 NTPMTKVITYNSDKGGSNTKTAEFDFSEVTFEKPVGYYYKVTEEKIDKVPVSYDTT
 SYTVQVHVLWNEEQQKPVATYIVGYKEGSKVPIQFKNSLDSTTLTVKKKVSQTGGD
 RSKDFNFGTLKANQYYKASEKVMIEKTTKGGQAPVQTEASIDQLYHFTLKDGESIK
 VTNLPGVDYVVTEDDYKSEKYTTNVEVSPQDGA VKNIAGNSTEQETSTDKDMTI

> **SEQ ID NO: 58** **Белок капсида AP205**

ANKPMQPITSTANKIVWSDPTRLSTTFSASLLRQVRVKVGIAELNNVSGQYVSVYKRPA
 PKPEGCADACVIMPNENQSIRTVISGSAENLATLKAETHKRNVDTLFASGNAGLG
 FLDPTAAIVSSDTTA

> SEQ ID NO: 59 Белок капсида фага Fr

ASNFEFVLVDNGGTGDVKVAPSNFANGVAEWISSNSRSQAYKVTCSVRQSSANNR
KYTVKVEVPKVATQVQGGVELPVAAWRSYMNMELTIPVFATNDDCALIVKALQGTF
KTGNPIATAIAANSKIY

> SEQ ID NO: 60 SpyCatcherΔN

DSATHIKFSKRDEDEGKELAGATMELRDSSGKTISTWISDGQVKDFYLYPGKYTFVET
AAPDGYEVATAITFTVNEQGQVTVNGKATKGDAHI

> SEQ ID NO: 61 SpyCatcherΔNC

DSATHIKFSKRDEDEGKELAGATMELRDSSGKTISTWISDGQVKDFYLYPGKYTFVET
AAPDGYEVATAITFTVNEQGQVTVNGKATKG

> SEQ ID NO: 62 Spy-AP205

MAHIVMVDAYKPTKSGTAGGGSGSANKPMQPITSTANKIVWSDPTLSTTFASLL
RQVRVKVGIAELNNVSGQYVSVYKRPAPKPEGCADACVIMPNENQSIRTVISGSAENL
ATLKAEWETHKRNVDTLFASGNAGLGFLDPTAAIVSSDTTA

> SEQ ID NO: 63 Spy-AP205

ATGGCACATATTGTTATGGTGGATGCATATAAACCGACCAAAGGTAGCGGTACAG
CCGGTGGTGGTAGTGGTAGCGCAAATAAACCGATGCAGCCGATTACCAGCACCG
CAAACAAAATTGTTTGGAGCGATCCGACCCGTCTGAGCACCACTTTAGCGCAAG
CCTGCTGCGTCAGCGTGTTAAAGTTGGTATTGCAGAACTGAATAATGTGAGCGGT
CAGTATGTTAGCGTGTATAAACGTCCGGCACCGAAACCGGAAGGTTGTGCAGATG
CATGTGTTATTATGCCGAATGAAAATCAGAGCATTTCGTACCGTTATTAGCGGTAG
CGCAGAAAATCTGGCAACCCTGAAAGCAGAATGGGAAACCCATAAACGTAATGT
GGATACCCTGTTTGCAAGCGGTAATGCAGGTCTGGGTTTTCTGGACCCGACCGCA
GCAATTGTTAGCAGCGATACCACCGCATAA

> SEQ ID NO: 64 AP205-spy

MANKPMQPITSTANKIVWSDPTLSTTFASLLRQVRVKVGIAELNNVSGQYVSVYKR
PAPKPEGCADACVIMPNENQSIRTVISGSAENLATLKAEWETHKRNVDTLFASGNAG
LGFLDPTAAIVSSDTTAGTAGGSGAHIVMVDAYKPTK

> SEQ ID NO: 65 AP205-spy

ATGGCAAATAAACCGATGCAGCCGATTACCAGCACCGCAAACAAAATTGTTTGG
 AGCGATCCGACCCGTCTGAGCACCACTTTAGCGCAAGCCTGCTGCGTCAGCGTG
 TTAAAGTTGGTATTGCAGAACTGAATAATGTGAGCGGTCAGTATGTTAGCGTGTA
 TAAACGTCCGGCACCGAAACCGGAAGGTTGTGCAGATGCATGTGTTATTATGCCG
 AATGAAAATCAGAGCATTCTGACCGTTATTAGCGGTAGCGCAGAAAATCTGGCA
 ACCCTGAAAGCAGAATGGGAAACCCATAAACGTAATGTGGATACCCTGTTTGCA
 AGCGGTAATGCAGGTCTGGGTTTTCTGGACCCGACCGCAGCAATTGTTAGCAGCG
 ATACCACCGCAGGTACAGCCGGTGGTAGCGGTGCACATATTGTTATGGTTGATGC
 ATATAAACCGACCAAATAA

> SEQ ID NO: 66 Spy-φar fr

MAHIVMVDAYKPTKSGTAGGGSGSASNFEFVLVDNNGGTGDVKVAPSNFANGVA
 EWISSNSRSQAYKVTCVSRQSSANNRKYTVKVEVPKVATQVQGGVELPVAAWRSY
 MNMELTIPVFATNDDCALIVKALQGTFTGNPIATAIAANSIGY

> SEQ ID NO: 67 Spy-φar fr

ATGGCACATATTGTTATGGTGGATGCATATAAACCGACCAAAGGTAGCGGTACAG
 CCGGTGGTGGTAGTGGTAGCGCAAGCAATTTTGAAGAATTTGTGCTGGTTGATAA
 TGGTGGCACCGGTGATGTTAAAGTTGCACCGAGTAATTTTGCAAATGGTGTGCA
 GAATGGATTAGCAGCAATAGCCGTAGCCAGGCATATAAAGTTACCTGTAGCGTTC
 GTCAGAGCAGCGCAAATAATCGTAAATATACCGTTAAAGTCGAGGTTCCGAAAG
 TTGCAACCCAGGTTTCAGGGTGGTGTGAACTGCCGGTTGCAGCATGGCGTAGCTA
 TATGAATATGGAAGTACCATTCCGGTTTTTGCCACCAATGATGATTGTGCCCTGA
 TTGTTAAAGCACTGCAGGGCACCTTTAAACCGGTAATCCGATTGCAACCGCAAT
 TGCAGCAAATAGCGGTATCTATTAA

> SEQ ID NO: 68 Ktag-AP205

ATHIKFSKRDGSGTAGGGSGSANKPMQPITSTANKIVWSDPTRLSTTFASLLRQVRK
 VGIAELNNVSGQYVSVYKRPAPKPEGCADACVIMPNNQSIRTVISGAENLATLKAE
 WETHKRNVDTLFASGNAGLGFLDPTAAIVSSDTTA

> SEQ ID NO: 69 AP205-Ktag

MANKPMQPITSTANKIVWSDPTRLSTTFASLLRQRVKVGIAELNNVSGQYVSVYKR
 PAKPEGCADACVIMPNENQSIRTVISGSAENLATLKAEWETHKRNVDTLFASGNAG
 LGFLDPTAAIVSSDTTAGTAGGSGATHIKFSKRD

> SEQ ID NO: 70 Ktag-φar fr

ATHIKFSKRDGSGTAGGGSGSASNFEFVLVDNGGTGDVKVAPSNFANGVAEWISSN
 SRSQAYKVTCVSRQSSANNRKYTVKVEVPKVATQVQGGVELPVAAWRSYMNMELT
 IPVFATNDDCALIVKALQGTFKTGNPIATAIAANSIY

> SEQ ID NO: 71 Spy-AP205-Spy

MAHIVMVDAYKPTKSGTAGGGSGSANKPMQPITSTANKIVWSDPTRLSTTFASLL
 RQRVKVGIAELNNVSGQYVSVYKRPAPKPEGCADACVIMPNENQSIRTVISGSAENL
 ATLKAEWETHKRNVDTLFASGNAGLGFLDPTAAIVSSDTTAGTAGGSGAHIVMVDA
 YKPTK

> SEQ ID NO: 72 Spy-AP205-Spy

ATGGCACATATTGTTATGGTGGATGCATATAAACCGACCAAAGGTAGCGGTACAG
 CCGGTGGTGGTAGTGGTAGCGCAAATAAACCGATGCAGCCGATTACCAGCACCG
 CAAACAAAATTGTTTGGAGCGATCCGACCCGTCTGAGCACCACTTTAGCGCAAG
 CCTGCTGCGTCAGCGTGTTAAAGTTGGTATTGCAGAACTGAATAATGTGAGCGGT
 CAGTATGTTAGCGTGTATAAACGTCCGGCACCGAAACCGGAAGGTTGTGCAGATG
 CATGTGTTATTATGCCGAATGAAAATCAGAGCATTCGTACCGTTATTAGCGGTAG
 CGCAGAAAATCTGGCAACCCTGAAAGCAGAATGGGAAACCCATAAACGTAATGT
 GGATACCCTGTTTGCAAGCGGTAATGCAGGTCTGGGTTTTCTGGACCCGACCGCA
 GCAATTGTTAGCAGCGATAACCACCGCAGGTACAGCCGGTGGTAGCGGTGCACAT
 ATTGTTATGGTTGATGCATATAAACCGGACCAAATAA

> SEQ ID NO: 73 AP205-ggsg-Spycatcher

ATGGCAAATAAACCGATGCAGCCGATTACCAGCACCGCAAACAAAATTGTTTGG
 AGCGATCCGACCCGTCTGAGCACCACTTTAGCGCAAGCCTGCTGCGTCAGCGTG
 TTAAAGTTGGTATTGCAGAACTGAATAATGTGAGCGGTCAGTATGTTAGCGTGTA
 TAAACGTCCGGCACCGAAACCGGAAGGTTGTGCAGATGCATGTGTTATTATGCCG
 AATGAAAATCAGAGCATTCGTACCGTTATTAGCGGTAGCGCAGAAAATCTGGCA
 ACCCTGAAAGCAGAATGGGAAACCCATAAACGTAATGTGGATACCCTGTTTGCA

AGCGGTAATGCAGGTCTGGGTTTTCTGGACCCGACCGCAGCAATTGTTAGCAGCG
 ATACCACCGCAGGTACAGCCGGTGGTAGCGGTGGTGCAATGGTTGATACCCTG
 AGCGGTCTGAGCAGCGAACAGGGTCAGAGCGGTGATATGACCATTGAAGAAGAT
 AGCGCAACCCACATCAAATTCAGCAAACGTGATGAAGATGGTAAAGAACTGGCA
 GGCGCAACAATGGAACCTGCGTGATAGCAGCGGTAAAACCATTAGCACCTGGATT
 AGTGATGGTCAGGTGAAAGATTTTTATCTGTACCCTGGCAAATACACCTTTGTTG
 AAACCGCAGCACCGGATGGTTATGAAGTTGCAACCGCAATTACCTTTACCGTTAA
 TGAACAGGGCCAGGTTACCGTGAATGGTAAAGCAACCAAAGGTGATGCACATAT
 Ttaa

> **SEQ ID NO: 74 AP205-gsg-Spycatcher**

MANKPMQPITSTANKIVWSDPTRLSTTFASLLRQRVKVGIAELNNVSGQYVSVYKR
 PAPKEGCADACVIMPENQSIRTVISGSAENLATLKAETHKRNVDTLFASGNAG
 LGFLDPTAAIVSSDTTAGTAGSGGAMVDLTLGLSSEQGQSGDMTIEEDSATHIKFSK
 RDEDGKELAGATMELRDSSGKTISTWISDGQVKDFYLYPGKYTFVETAAPDGYEVAT
 AITFTVNEQGQVTVNGKATKGAHI

> **SEQ ID NO: 75 SpyCatcher-gsgs-AP205**

GGTGCAATGGTTGATACCCTGAGCGGTCTGAGCAGCGAACAGGGTCAGAGCGGT
 GATATGACCATTGAAGAAGATAGCGCAACCCACATCAAATTCAGCAAACGTGAT
 GAAGATGGTAAAGAACTGGCAGGCGCAACAATGGAACCTGCGTGATAGCAGCGGT
 AAAACCATTAGCACCTGGATTAGTGATGGTCAGGTGAAAGATTTTTATCTGTACC
 CTGGCAAATACACCTTTGTTGAAACCGCAGCACCGGATGGTTATGAAGTTGCAAC
 CGCAATTACCTTTACCGTTAATGAACAGGGCCAGGTTACCGTGAATGGTAAAGCA
 ACCAAAGGTGATGCACATATTGGTGGTAGCGGTAGCGCAAAATAAACCGATGCAGC
 CGATTACCAGCACCGCAAACAAAATTGTTTGGAGCGATCCGACCCGTCTGAGCAC
 CACCTTTAGCGCAAGCCTGCTGCGTCAGCGTGTTAAAGTTGGTATTGCAGAACTG
 AATAATGTGAGCGGTCAGTATGTTAGCGTGTATAAACGTCCGGCACCGAAACCGG
 AAGGTTGTGCAGATGCATGTGTTATTATGCCGAATGAAAATCAGAGCATTCGTAC
 CGTTATTAGCGGTAGCGCAGAAAATCTGGCAACCCTGAAAGCAGAATGGGAAAC
 CCATAAACGTAATGTGGATACCCTGTTTGCAAGCGGTAATGCAGGTCTGGGTTTT
 CTGGACCCGACCGCAGCAATTGTTAGCAGCGATACCACCGCATAA

> SEQ ID NO:76 SpyCatcher-ggsgs-AP205

MVDTL SGLSSEQQSGDMTIEEDSATHIKFSKRDEDGKELAGATMELRDSSGKTIST
WISDGQVKDFYLYPGKYTFVETAAPDGYEVATAITFTVNEQQQVTVNGKATKGDAH
IGGSGSANKPMQPITSTANKIVWSDPTLSTTFSASLLRQVRVKVGIAELNNVSGQYVS
VYKRPAKPEGCADACVIMPNNQSIRTVISGAENLATLKAEWETHKRNVDTLFAS
GNAGLGFLDPTAAIVSSDTTA

> SEQ ID NO: 77 SpyCatcher-ggsgs-φar fr

GGTGCAATGGTTGATACCCTGAGCGGTCTGAGCAGCGAACAGGGTCAGAGCGGT
GATATGACCATTGAAGAAGATAGCGCAACCCACATCAAATTCAGCAAACGTGAT
GAAGATGGTAAAGAACTGGCAGGCGCAACAATGGAAGTGCCTGATAGCAGCGGT
AAAACCATTAGCACCTGGATTAGTGATGGTCAGGTGAAAGATTTTTATCTGTACC
CTGGCAAATACACCTTTGTTGAAACCGCAGCACCGGATGGTTATGAAGTTGCAAC
CGCAATTACCTTTACCGTTAATGAACAGGGCCAGGTTACCGTGAATGGTAAAGCA
ACCAAAGGTGATGCACATATTGGTGGTAGCGGTAGCGCAAGCAATTTGAAGA
ATTTGTGCTGGTTGATAATGGTGGCACCGGTGATGTTAAAGTTGCACCGAGTAAT
TTTGCAAATGGTGTTCGAGAATGGATTAGCAGCAATAGCCGTAGCCAGGCATATA
AAGTTACCTGTAGCGTTCGTCAGAGCAGCGCAAATAATCGTAAATATACCGTTAA
AGTCGAGGTTCCGAAAGTTGCAACCCAGGTTTCAGGGTGGTGTGAACTGCCGTT
GCAGCATGGCGTAGCTATATGAATATGGAAGTACCATTCCGGTTTTTGCCACCA
ATGATGATTGTGCCCTGATTGTTAAAGCACTGCAGGGCACCTTTAAACCGGTAA
TCCGATTGCAACCGCAATTGCAGCAAATAGCGGTATCTATTAA

> SEQ ID NO: 78 SpyCatcher-ggsgs-φar fr

MVDTL SGLSSEQQSGDMTIEEDSATHIKFSKRDEDGKELAGATMELRDSSGKTIST
WISDGQVKDFYLYPGKYTFVETAAPDGYEVATAITFTVNEQQQVTVNGKATKGDAH
IGGSGSASNFEFVLVDNNGGTGDVKVAPSNFANGVAEWISSNSRSQAYKVTCSVRQS
SANNRKYTVKVEVPKVATQVQGGVELPVAAWRSYMNEMELTIPVFATNDDCALIVK
ALQGTFTGNPIATAIAANSKIY

> SEQ ID NO: 79

>SpyTag- Her2-ECD|23-686-HIS

MAHIVMVDAYKPTKGGSTQVCTGTDMKLRLPASPETHLDMLRHLYQGCQVVQGNL
ELTYLPTNASLSFLQDIQEVQGYVLIHNVQRQVPLQRLRIVRGTLQFEDNYALAVLD
NGDPLNNTTPVTGASPGGLRELQLRSLTEILKGGVLIQRNPQLCYQDTILWKDIFHKN
NQLALTLIDTNRSRACHPCSPMCKGSRCWGESSEDCQSLTRTVACGGCARCKGPLPT

DCCHEQCAAGCTGPKHSDCLACLFHNHSGICELHCPALVTYNTDTFESMPNPEGRYT
 FGASCVTACPYNYLSTDVGSCTLVCPLHNQEVTAEDGTQRCEKCSKPCARVCYGLG
 MEHLREVRAVTSANIQEFAGCKKIFGSLAFLPESFDGDPASNTAPLQPEQLQVFETLEE
 ITGYLYISAWPDSLPLSVFQNLQVIRGRILHNGAYSLTLQGLGISWLGRLSLRELGS
 LALIHNTHLCFVHTVPWDQLFRNPHQALLHTANRPEDECVGEGLACHQLCARGHC
 WGPPTQCVNCSQFLRGQECVEECRVLQGLPREYVNAHCLPCHPECQPQNGSVTC
 FGPEADQCVACAHYKDPPFCVARCPGSKPDLSYMPIWKFPDEEGACQPCPINCTHS
 CVDLDDKGCPAEQRASPLTSIISAVVGILLVVVLGVVFGILIKRRQKIRKYTHHHHH
 H

> SEQ ID NO: 80

> SpyTag -IL-5(C63T/C105T)

MAHIVMVDAYKPTKGGSIPTSEALVKETLALLSTHRTLLIANETLRIPVPVHKNHQ
 LTTEEIFQGIGTLESQTVQGGTVERLFKNLSLIKKYIDGQKKKTGEERRRVNQFLDYL
 QEFLGVMNTEWIIES*SGRK

> SEQ ID NO: 81

> PCSK9[31-692]:SpyTag

QEDEDGDYEELVLALRSEEDGLAEAPEHGTATFHRCADPWRLPGTYVVVLKEET
 HLSQSERTARRLQAQAARRGYLTKILHVFHGLLPGLVKMSGDLLELALKLPHVDYI
 EEDSSVFAQSIPWNLERITPPRYRADEYQPPDGGSLVEVYLLDTSIQSDHREIEGRVMV
 TDFENVPEEDGTRFHRQASKCDSHGTHLAGVVSGRDAGVAKGASMRSLRVLNCQG
 KGTVSGTLIGLEFIRKSQLVQPVGPLVLLPLAGGYSRVLNAACQRLARAGVVLT
 AGNFRDDACLYSPASAPEVITVGATNAQDQPVTLGTLGTNFGRCVDLFAPEGDIIGAS
 SDCSTCFVSQSGTSQAAAHVAGIAAMMLSAEPELTLAELRQRLIHFSKDVINEAWFP
 EDQRVLTPLNVAALPPSTHGAGWQLFCRTVWSAHSGPTRMATAVARCAPDEELLSC
 SSFSRSGKRRGERMEAQGGKLVCRAHNAFGGEGVYAIARCCLLPQANCSVHTAPPA
 EASMGTRVHCHQQGHVLTGCSHWEVEDLGTHKPPVLRPRGQPNQCVGHREASIHA
 SCCHAPGLECKVKEHGIPAPQEQTVAEEGWTLTGCSALPGTSHVLGAYAVDNTC
 VVRSRDVSTTGSTSEGAVTAVAICCRSRHLAQASQELQGGSAHIVMVDAYKPTK

> SEQ ID NO: 82

SpyTag-ID1ID2a-HIS

AHIVMVDAYKPTKGGSNYIKGDPYFAEYATKLSFILNPSDANNPSGETANHNDACN
 CNESGISSVGQAQTS GPSSNKT CITHSSIKTNKKKECKDVKLGVRENDKDLKICVIEDT
 SLSGVDNCCCQDLLGILQENCSDNKRGSNDSCDNKNQDECQKKLEKVFASLTNGY
 KCDKCKSGTSRKKKWIWKSSGNEEGLQEEYANTIGLPPRTQSLYLGNLPKLENV
 EDVKDINFDTKEKFLAGCLIVSFHEGKNLKKRYPQNKNSGNKENLCKALEYSFADYG

DLIKGTSIWDNEYTKDLELNLQNNFGKLFKGKIKKNNTAEQDTSYSSLDELRESWWN
 TNKKYIWTAMKHGAEMNITTCNADGSVTGSGSSCDDIPTIDLIPQYLRFLQEWVENF
 CEQRQAKVKDVITNCKSCKESGNKCKTECKTKCKDECEKYKKFIEACGTAGGGIGTA
 GSPWSKRWDQIYKRYSKHIEDAKRNRKAGTKNCGTSSTNAAASTDENKCVQSDID
 SFFKHLIDIGLTPSSYLSNVLDDNICGADKAPWTTYTTYTTTEKCNKERDKSKSQSS
 DTLVVVNVPSPLGNTPYRYKYACQCKIPTNEETCDDRKEYMNQWSCGSARTMKRG
 YKNDNYELCKYNGVDVKPTTVRSNSSKLDHHHHHH

> SEQ ID NO: 83

Короткий гибкий линкер

GGSGS

>SEQ ID NO: 84

SpyCatcher-Ag85A

GAMVDTLISGLSSEQQSGDMTIEEDSATHIKFSKRDEDEGKELAGATMELRDSSGKTIS
 TWISDGQVKDFLYPGKYTFVETAAPDGYEVATAITFTVNEQGQVTVNGKATKGDA
 HIGGSFSRPGLPVEYLQVPSPSMGRDIKVQFQSGGANSPALYLLDGLRAQDDFSGWDI
 NTPAFEWYDQSGLSVVMVGGQSSFYSDWYQPACGKAGCQTYKWETFLTSELPGW
 LQANRHVKPTGSAAVGLSMAASSALTLAIYHPQQFVYAGAMSGLLDPSQAMGPTLI
 GLAMGDAGGYKASDMWGPKEPAWQRNDPLNVGKLIANNTRVWVYCGNGKLS
 DLGGNNLPAKFLEGFVRTSNIKFQDAYNAGGGHNGVDFPDPSGTHSWEYWGAQLN
 AMKPDQLRALGATPNTGPAPQGA

>SEQ ID NO: 85

ДНК SpyCatcher-Ag85A

GGTGCAATGGTTGATACCCTGAGCGGTCTGAGCAGCGAACAGGGTCAGAGCGGT
 GATATGACCATTGAAGAAGATAGCGCAACCCACATCAAATTCAGCAAACGTGAT
 GAAGATGGTAAAGAACTGGCAGGCGCAACAATGGAAGTGCCTGATAGCAGCGGT
 AAAACCATTAGCACCTGGATTAGTGATGGTCAGGTGAAAGATTTTATCTGTACC
 CTGGCAAATACACCTTTGTTGAAACCGCAGCACCGGATGGTTATGAAGTTGCAAC
 CGCAATTACCTTTACCGTTAATGAACAGGGCCAGGTTACCGTGAATGGTAAAGCA
 ACCAAAGGTGATGCACATATTGGTGGTAGCTTCTCCCGTCCCGGACTGCCTGTGG
 AATACCTCCAGGTGCCCTCCCCCTCTATGGGTCGTGACATCAAGGTGCAGTTCCA
 GTCCGGTGGTGCTAACTCCCCCGCTCTGTACCTGCTGGACGGACTGCGTGCTCAG
 GACGACTTCTCCGGCTGGGACATCAACACTCCCGCTTTCGAGTGGTACGACCACT
 CCGGCCTGTCCGTGGTTATGCCTGTGGGTGGCCAGTCCTCCTTCTACTCCGACTGG
 TACCAACCCGCTTGCGGCAAGGCTGGCTGCCAGACCTACAAGTGGGAGACTTTC
 TGACCTCCGAGCTGCCCCGATGGCTGCAGGCTAACCGTCACGTGAAGCCCACCGG

TTCCGCTGTCGTGGGCCTGTCTATGGCTGCTTCCTCCGCTCTGACCCTGGCTATCT
 ACCACCCCCAGCAGTTCGTGTACGCTGGCGCTATGTCCGGAAGTGTGGACCCCTC
 TCAGGCTATGGGTCCTACCCTGATCGGCCTGGCTATGGGCGACGCTGGTGGTTAC
 AAGGCTTCCGACATGTGGGGTCCCAAGGAAGATCCCGCTTGGCAGCGTAACGAC
 CCCCTGCTGAACGTGGGCAAGCTGATCGCTAACAACACCCGTGTGTGGGTGTACT
 GCGGCAACGGCAAGCTGTCCGACCTGGGTGGCAACAACCTGCCCGCTAAGTTCCT
 CGAGGGTTTCGTGCGCACCTCCAACATCAAGTTCAGGACGCTTACAACGCTGGC
 GGTGGTCACAACGGCGTGTTCGACTTCCCCGACTCCGGAACCCACTCCTGGGAGT
 ACTGGGGTGCTCAGCTGAACGCTATGAAGCCCGACCTGCAGCGTGCTCTGGGTGC
 TACCCCTAACACCGGTCCAGCTCCTCAGGGTGCTTAA

> SEQ ID NO: 86. ДНК SpyCatcher-ggs-супвивин

GAMVDTL SGLSSEQQSGDMTIEEDSATHIKFSKRDEGKELAGATMELRDSSGKTIS
 TWISDGQVKDFYLYPGKYTFVETAAPDGYEVATAITFTVNEQGQVTVNGKATKGDA
 HIGGSGAPALPQIWQLYLKNIYRIATFKNWPFLDCACTPERMAEAGFIHCPTENEPDL
 AQCFFCFKELEGWEPDDNPIEEHRKHSPGCAFLTVKKQMEELTVSEFLKLDQRQAKN
 KIAKETNNKQKEFEETAKTTRQSIEQLAA

> SEQ ID NO: 87. ДНК SpyCatcher-ggs-супвивин

GGTGCAATGGTTGATACCCTGAGCGGTCTGAGCAGCGAACAGGGTCAGAGCGGT
 GATATGACCATTGAAGAAGATAGCGCAACCCACATCAAATTCAGCAAACGTGAT
 GAAGATGGTAAAGAACTGGCAGGCGCAACAATGGAAGTGCCTGATAGCAGCGGT
 AAAACCATTAGCACCTGGATTAGTGATGGTCAGGTGAAAGATTTTTATCTGTACC
 CTGGCAAATACACCTTTGTTGAAACCGCAGCACCGGATGGTTATGAAGTTGCAAC
 CGCAATTACCTTTACCGTTAATGAACAGGGCCAGGTACCGTGAATGGTAAAGCA
 ACCAAAGGTGATGCACATATTGGTGGTAGCGGTGCACCGGCACTGCCGCAGATTT
 GGCAGCTGTATCTGAAAACTATCGTATCGCCACCTTTAAAACTGGCCGTTTCT
 GGAAGATTGTGCATGTACACCGGAACGTATGGCAGAAGCAGGTTTTATTCATTGT
 CCGACCGAAAAATGAACCGGATCTGGCACAGTGTTTTTTTTGCTTTAAAGAACTGG
 AAGGTTGGGAGCCGGATGATAATCCGATTGAAGAACATCGTAAACATAGTCCGG
 GTTGTGCATTTCTGACCGTGAAAAACAAATGGAAGAACTGACCGTTAGCGAGTT
 TCTGAAACTGGATCGTCAGCGTGCCAAAAACAAAATTGCAAAAGAAACCAATAA
 CAAACAGAAAGAATTCGAAGAAACCGCCAAAACACCCGTCAGAGCATTGAACA
 GCTGGCAGCATAA

>SEQ ID NO: 88. Mini-HA-stem-Spytag

MKVKLLVLLCTFTATYADTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLENGGGG
 KYVCSAKLRMVTGLRNKPSKQSQGLFGAIAGFTEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQG
 SGYAADQKSTQNAINGITNKVNSVIEKMNTQYTAIGCEYNKSERCMKQIEDKIEEIES
 KIWTYNAELLVLENERTLDFHDSNVKNLYEKVKSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCN
 DECMEVSKNGTYDYPKYSEESKLNREKIDGVKLESMGVYQIEGAHIVMVDAYKPTK

>SEQ ID NO: 89. ДНК Mini-HA-stem-Spytag

ATGAAAGTGAAGCTGCTGGTGGTGGTGTGCACCTTACCGCCACCTACGCCGACA
 CCATCTGCATCGGCTACCACGCCAACACAGCACCGACACCGTGGATACCGTGGT
 GGAAAAGAACGTGACCGTGACCCACAGCGTGAACCTGCTGGAAAATGGCGGCGG
 AGGCAAATACGTGTGCAGCGCCAAGCTGCGGATGGTCACCGGCCTGAGAAACAA
 GCCCAGCAAGCAGAGCCAGGGCCTGTTCGGAGCCATTGCCGGCTTTACAGAGGG
 CGGCTGGACCGGCATGGTGGATGGGTGGTACGGCTATCACACCAGAACGAGCA
 GGGCAGCGGCTACGCCGCCGATCAGAAGTCTACCCAGAACGCCATCAACGGCAT
 CACCAACAAAGTGAACAGCGTGATCGAGAAGATGAACACCCAGTACACCGCCAT
 CGGCTGCGAGTACAACAAGAGCGAGCGGTGCATGAAGCAGATCGAGGACAAGAT
 CGAAGAGATCGAGTCTAAGATCTGGACCTACAACGCCGAACCTGCTGGTGGTGGT
 GAAAACGAGCGGACCCTGGACTTCCACGACAGCAACGTGAAGAACCTGTACGAG
 AAAGTGAAAAGCCAGCTGAAGAACAACGCCAAAGAGATCGGCAACGGCTGCTTC
 GAGTTCTACCACAAGTGCAACGACGAGTGCATGGAAAGCGTGAAGAATGGCACC
 TACGACTACCCCAAGTACAGCGAGGAAAGCAAGCTGAACCGCGAGAAGATCGAC
 GCGGTGAAGCTGGAATCTATGGGCGTGTACCAGATTGAGGGCGCCACATCGTG
 ATGGTGGACGCCTACAAGCCTACCAAG

>SEQ ID NO: 90. G-белок вируса инфекционного некроза гемопоэтической ткани (IHNV)-SpyTag

MDTMITPLILITCGANSQTVQPDASESDQPTWSNPLFTYPEGCTLDKLSKVNASQ
 LRCPRIFNDENRGLIAYPTSIRSLSVGNLGNHTQGNYYHKVLYRTICSTGFFGGQTIE
 KALVEMKLSTREAGVYDTTTTAAALYFPAPRCQWYTDNVQNDLIFYTTQKSVLRDP
 YTRDFLDSDFIGGCKTKSPCQTHWSNVVWMDAGIPACDSSQEIKGHLFVDKISNRV
 VKATSYGHHPWGLHHACMIDFCGKPWIRTDLGDLSVEYNSGAKTLSFPKCEDKTVG
 MRGNLDDFAYLDDLKASESREECLEAHAEIISTNSVTPYLLSKFRSPHPGINDVYAM
 HKGSIYHGMCMTVAVDEVSKDRTTYRAHRATSFTKWERPFGDEWEGFHGLHGNNT

TIIPDLEKYVAQYKTSMMEPMSIKSVPHPSILAHYNETDVSGISIRKLDSFDLQSLHWS
GSGAHIVMVDAYKPTK

>SEQ ID NO: 91. **SpyTag-G-белок IHNV**

AHIVMVDAYKPTKGGSDTMITPLILITCGANSQTVQPDASESDQPTWSNPLFTYP
EGCTLDKLSKVNASQLRCPRIENDENRGLIAYPTSIRSLSVGNDLGNihtQGNYIHKVL
YRTICSTGFFGGQTIEKALVEMKLSTREAGVYDTTTAAALYFPAPRCQWYTDNVQND
LIFYTTQKSVLRDPYTRDFLDSDFIGGKCTKSPCQTHWSNVVWMDAGIPACDSSQ
EIKGHLFVDKISNRVVKATSYGHHPWGLHHACMIDFCGKPWIRTDLGDLISVEYNSG
AKTLSFPKCEDKTVGMRGNLDDFAYLDDLKASESREECLEAHAEIISTNSVTPYLLS
KFRSPHPGINDVYAMHKGSYHGMCM TVAVDEVSKDRTTYRAHRATSFTKWERPFG
DEWEGFHGLHGNNTTIIPDLEKYVAQYKTSMMEPMSIKSVPHPSILAHYNETDVSGIS
IRKLDSFDLQSLHWS

>SEQ ID NO: 92. **LongSpyTag-AP205-LongSpyTag**

MAHIVMVDAYKPTKSGTAGGGSGSANKPMQPITSTANKIVWSDPTRLSTTFASLL
RQRVKVGIAELNNVSGQYVSUYKRPAPKPEGCADACVIMPENQSIRTVISGSAENL
ATLKAETHKRNVDTLFASGNAGLGFLDPTAAIVSSDTTAGTASGGSGGSGAHIVM
VDAYKPTK

> SEQ ID NO: 93. **ДНК LongSpyTag-AP205-LongSpyTag**

ATGGCACATATTGTTATGGTGGATGCATATAAACCGACCAAAGGTAGCGGTACAG
CCGGTGGTGGTAGTGGTAGCGCAAATAAACCGATGCAGCCGATTACCAGCACCG
CAAACAAAATTGTTTGGAGCGATCCGACCCGTCTGAGCACCACTTTAGCGCAAG
CCTGCTGCGTCAGCGTGTTAAAGTTGGTATTGCAGAACTGAATAATGTGAGCGGT
CAGTATGTTAGCGTGTATAAACGTCCGGCACCGAAACCGGAAGGTTGTGCAGATG
CATGTGTTATTATGCCGAATGAAAATCAGAGCATTCGTACCGTTATTAGCGGTAG
CGCAGAAAATCTGGCAACCCTGAAAGCAGAATGGGAAACCCATAAACGTAATGT
GGATACCCTGTTTGCAAGCGGTAATGCAGGTCTGGGTTTTCTGGACCCGACCGCA
GCAATTGTTAGCAGCGATACCACCGCAGGTACAGCCAGCGGTGGTAGCGGTGGT
AGCGGTGCACATATTGTTATGGTTGATGCATATAAACCGACCAAATAA

> SEQ ID NO: 94. **mSA-AP205**

MAEAGITGTWYNQHGSTFTVTAGADGNLTGQYENRAQGTGCQNSPYTLTGRYNGT
KLEWRVEWNNSTENCHSRTEWRGQYQGGAEARINTQWNLTYEGGSGPATEQGQDT

FTKVKGGSGSANKPMQPITSTANKIVWSDPTRLSTTFASLLRQVRVKVGIAELNNVSG
 QYVSVYKRPAPKPEGCADACVIMPNNENQSIRTVISGSAENLATLKAETHKRNVD
 LFASGNAGLGFLDPTAAIVSSDTTA

> SEQ ID NO: 94. ДНК mSA-AP205

ATGGCAGAAGCAGGTATTACCGGCACCTGGTATAATCAGCATGGTAGCACCTTTA
 CCGTTACCGCAGGCGCAGATGGTAATCTGACAGGTCAGTATGAAAATCGTGCACA
 GGGCACCGGTTGTCAGAATAGCCCGTATACCCCTGACCGGTCGTTATAATGGCACC
 AAAGTGAATGGCGTGTGAATGGAATAATAGCACCGAAAAATTGTCATAGCCGT
 ACCGAATGGCGTGGTCAGTATCAGGGTGGTGCAGAAGCCCGTATTAATACCCAGT
 GGAATCTGACCTATGAAGGTGGTAGCGGTCCGGCAACCGAACAGGGTCAGGATA
 CCTTTACCAAAGTTAAAGGTGGCAGCGGTAGCGCAAATAAACCGATGCAGCCGA
 TTACCAGCACCGCAAAACAAAATTGTTTGGAGCGATCCGACCCGTCTGAGCACCAC
 CTTTAGCGCAAGCCTGCTGCGTCAGCGTGTAAAGTTGGTATTGCAGAACTGAAT
 AATGTGAGCGGTCAAGTATGTTAGCGTGTATAAACGTCCGGCACCGAAACCGGAA
 GGTTGTGCAGATGCATGTGTTATTATGCCGAATGAAAATCAGAGCATTTCGTACCG
 TTATTAGCGGTAGCGCAGAAAATCTGGCAACCCTGAAAGCAGAATGGGAAACCC
 ATAAACGTAATGTGGATACCCTGTTTGAAGCGGTAATGCAGGTCTGGGTTTTCT
 GGACCCGACCGCAGCAATTGTTAGCAGCGATACCACCGCATAA

Библиография

Bachmann, MF. and Jennings, Gary T. Vaccine delivery: a matter of size, geometry, kinetics and molecular patterns. *Nat Rev Immunol* 10(11), 787-796. 2010.

Bachmann MF, Jennings GT. Therapeutic vaccines for chronic diseases: successes and technical challenges. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 2011;366(1579):2815-2822.

Bachmann MF, Zinkernagel, RM. Neutralizing antiviral B cell responses. *Annual review of immunology* 15: 235-270. 1997.

Bachmann, MF. et al. The influence of antigen organization on B cell responsiveness. *Science*. 262(5138), 1448-1451. 1993.

Bachmann, MF, Jennings, GT, 2004a. Virus-like particles: combining innate and adaptive immunity for effective vaccination. In: Kaufmann, P.D.S.H.E. (Ed.), *Novel Vaccination Strategies*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co, pp. 415–432.

Buck, Christopher B. and Thompson, Cynthia D. Production of Papillomavirus-Based Gene Transfer Vectors. *Current Protocols in Cell Biology*. 2001.

Chackerian B, Lowy DR, Schiller JT. Induction of autoantibodies to mouse CCR5 with recombinant papillomavirus particles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1999;96(5):2373-2378.

Chackerian B, Durfee MR, Schiller JT. Virus-Like Display of a Neo-Self Antigen Reverses B Cell Anergy in a B Cell Receptor Transgenic Mouse Model. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 2008;180(9):5816-5825.

Chackerian, B. Virus-like particles: flexible platforms for vaccine development. *Expert Review of Vaccines*. 6(3), 381-390. 2007.

Fierer JO, Veggiani G, Howarth M. SpyLigase peptide-peptide ligation polymerizes affibodies to enhance magnetic cancer cell capture. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2014;111(13):E1176-E1181.

Grgacic, Elizabeth V. L. and Anderson, David A. Virus-like particles: Passport to immune recognition. *Particle-based Vaccines. Methods* 40(1), 60-65. 2006.

Indulis Cielens, Ludmila Jackevica, Arnis Strods, Andris Kazaks, Velta Ose, Janis Bogans, Paul Pumpens, Regina Renhofa. Mosaic RNA Phage VLPs Carrying Domain III of the West Nile Virus E Protein. *Molecular Biotechnology*. 2014

Kouskoff, V. et al. T Cell-Independent Rescue of B Lymphocytes from Peripheral Immune Tolerance. *Science* 287 (5462). 2501-2503. 2000.

Murray K. Application of recombinant DNA techniques in the development of viral vaccines. *Vaccine*. 6:164-74,1988.

Peabody DS, Manifold-Wheeler B, Medford A, Jordan SK, Caldeira J do C, Chackerian B. Immunogenic Display of Diverse Peptides on Virus-Like Particles of RNA Phage MS2. *Journal of molecular biology* 2008;380(1):252-263.

Plotkin, SA. Vaccines: past, present and future. *Nat Med*. 5-4-2005.

P. Pushko, T. Kozlovskaya, I. Sominskaya, A. Brede, E. Stankevica, V. Ose, P. Pumpens, and E. Grens. Analysis of RNA phage fr coat protein assembly by insertion, deletion and substitution mutagenesis. *Protein Eng*. 1993.

Pumpens, P. and Grens, E. HBV Core Particles as a Carrier for B Cell/T Cell Epitopes. *Intervirology* 44(2-3), 98-114. 2001.

Raja, Krishnaswami S. et al. Icosahedral Virus Particles as Polyvalent Carbohydrate Display Platforms. *ChemBioChem* 4(12), 1348-1351. 2003.

Tissot AC, Renhofa R, Schmitz N, et al. Versatile Virus-Like Particle Carrier for Epitope Based Vaccines. Ho PL, ed. *PLoS ONE*. 2010

Zakeri, B. et al. *J. Am. Chem. Soc.*, 2010, 132 (13), pp 4526-4527

Zakeri, B. et al. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109(12), E690-E697. 2012.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Вакцина для применения в профилактике или лечении заболевания, причем вакцина содержит:
 - i) белок капсида вируса, содержащий первую пептидную метку, и
 - ii) антиген, слитый со второй пептидной меткой, причем первая пептидная метка способна взаимодействовать со второй пептидной меткой посредством образования изопептидной связи, и где антиген и белок капсида вируса связаны посредством изопептидной связи между первой и второй пептидной меткой, и при этом i-ii образуют вирусоподобную частицу, экспонирующую указанный антиген.
2. Вакцина по п.1, причем первая пептидная метка содержит Spytag, и при этом вторая пептидная

метка содержит SpyCatcher, причем антиген и белок капсида вируса связаны посредством изопептидной связи между SpyCatcher и SpyTag, и при этом i-ii образуют вирусоподобную частицу, экспонирующую указанный антиген.

3. Вакцина по любому из предыдущих пунктов, причем белок капсида вируса содержит белок капсида AP205.

4. Вакцина по любому из предыдущих пунктов, причем белок капсида вируса содержит белок капсида AP205, и при этом первая пептидная метка содержит одну или несколько SpyCatcher, и при этом SpyCatcher является слитой с N-концом или с C-концом белка капсида AP205, необязательно, через линкер.

5. Вакцина по любому из предыдущих пунктов, причем белок капсида AP205 является слитым с одной SpyCatcher на своем C-конце и с одной SpyCatcher на своем N-конце, необязательно, через линкер.

6. Вакцина по любому из предыдущих пунктов, причем белок капсида вируса содержит или состоит из белка капсида AP205, и при этом первая пептидная метка представляет собой одну или несколько SpyTag.

7. Вакцина по п.6, причем SpyTag является слитой с N-концом белка капсида AP205.

8. Вакцина по п.6, причем SpyTag является слитой с C-концом белка капсида AP205.

9. Вакцина по п.6, причем белок капсида AP205 является слитым с одной SpyTag на своем C-конце и с одной SpyTag на своем N-конце.

10. Вакцина по любому из предыдущих пунктов, причем белок капсида вируса, содержащий первую пептидную метку, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 76 или биологически активный вариант последовательности, который характеризуется по меньшей мере 70%, как например, 75%, как например, 80%, как например, 85%, как например, 90%, как например, 95%, как например, 96%, как например, 97%, как например, 98%, как например, 99%, как например, 99,5%, как например, 100% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 76.

11. Вакцина по любому из предыдущих пунктов, причем заболевание представляет собой злокачественную опухоль, такую как злокачественная опухоль молочной железы, злокачественная опухоль желудка, злокачественная опухоль яичника и/или серозная карцинома матки, сердечно-сосудистое заболевание, такое как дислипидемия, атеросклероз и/или гиперхолестеринемия, иммуновоспалительное заболевание, такое как эозинофильная астма, аллергия, полипоз носа, атопический дерматит, эозинофильный эзофагит, гиперэозинофильный синдром и синдром Черджа-Стросса, хроническое заболевание, неврологическое заболевание, инфекционное заболевание, такое как малярия, и/или туберкулез, и/или ВИЧ, и/или грипп, или заболевание, выбранное из группы, содержащей нарушение липидного обмена, такое как гиперлипидемия, гиперлипидемия I типа, II типа, III типа, IV типа или V типа, вторичная гипертриглицеридемия, гиперхолестеринемия, семейная гиперхолестеринемия, ксантоматоз, недостаточность холестерин-ацетилтрансферазы, атеросклеротическое состояние (например, атеросклероз), заболевание коронарной артерии, сердечно-сосудистое заболевание и болезнь Альцгеймера.

12. Вакцина по любому из предыдущих пунктов, причем антиген представляет собой полипептид, пептид и/или антигенный фрагмент полипептида, ассоциированные с ненормальной физиологической реакцией, и/или указанный антиген представляет собой белок, пептид и/или антигенный фрагмент из группы, содержащей полипептиды, специфичные в отношении злокачественной опухоли, полипептиды, ассоциированные с сердечно-сосудистыми заболеваниями, полипептиды, ассоциированные с астмой, полипептиды, ассоциированные с полипозом носа, полипептиды, ассоциированные с атопическим дерматитом, полипептиды, ассоциированные с эозинофильным эзофагитом, полипептиды, ассоциированные с гиперэозинофильным синдромом, полипептиды, ассоциированные с синдромом Черджа-Стросса и/или полипептиды, ассоциированные с патогенными организмами.

13. Вакцина по любому из предыдущих пунктов, причем SpyCatcher, слитая с антигеном, содержит:

i) полипептидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27 и SEQ ID NO: 28, или

ii) вариант последовательности указанной полипептидной последовательности, причем вариант последовательности характеризуется по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с последовательностями, содержащими SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27 и SEQ ID NO: 28.

14. Способ получения фармацевтической композиции, содержащей вакцину по любому из предыдущих пунктов, причем способ предусматривает стадии:

i) получения первого полипептида; белка капсида AP205, содержащего первую пептидную метку, выбранную из SpyCatcher, SpyTag или KTag, которые определены в любом из предыдущих пунктов, и

ii) получения второго полипептида; антигена, слитого со второй пептидной меткой, выбранной из SpyTag, KTag или SpyCatcher по любому из пп.1-13, причем первая и вторая пептидные метки различны и способны образовывать изопептидную связь; и

iii) воздействия на первый полипептид условиями, которые обеспечивают возможность образования вирусоподобных частиц, и

iv) получения вакцины с помощью связывания второго полипептида и указанных вирусоподобных

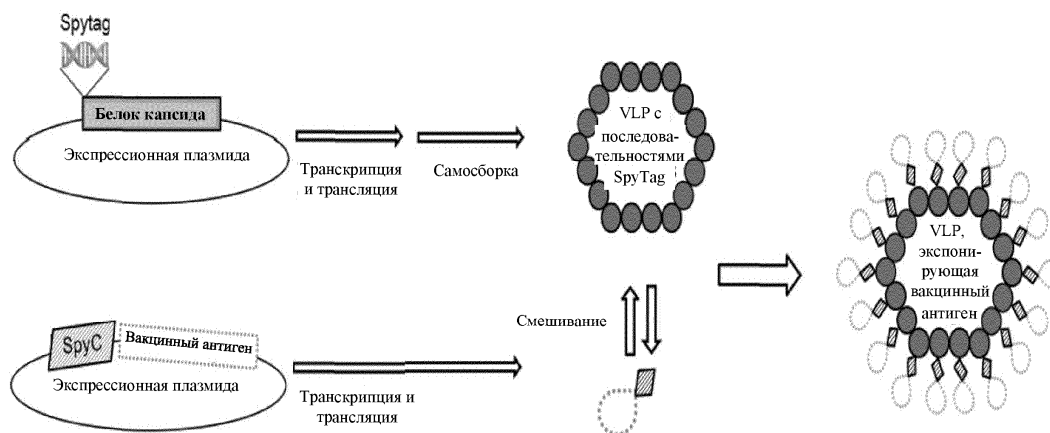
частиц посредством образования изопептидной связи между SpyCatcher и полипептидом SpyTag или KTag в указанных вирусоподобных частицах, и

v) образования композиции, содержащей указанную вакцину по любому из пп.1-13.

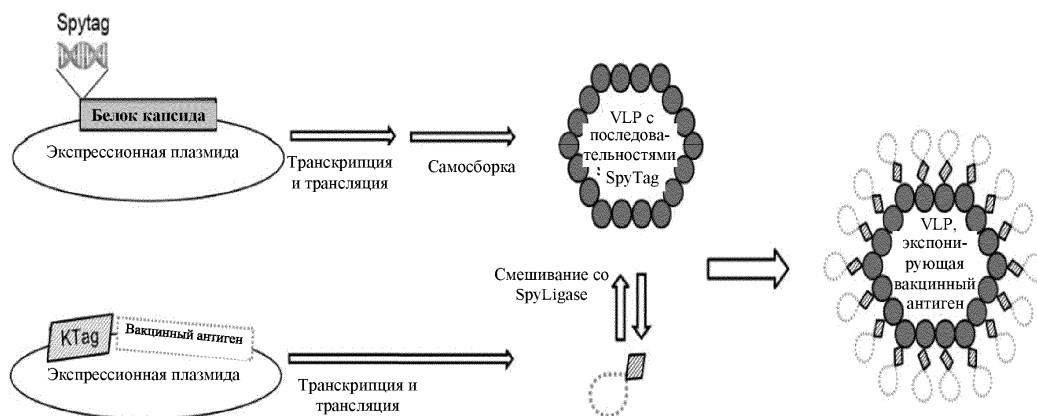
15. Способ введения вакцины для лечения или предупреждения клинического состояния у субъекта, нуждающегося в этом, предусматривающий стадии:

i) получения по меньшей мере одной вакцины по любому из пп.1-13, и

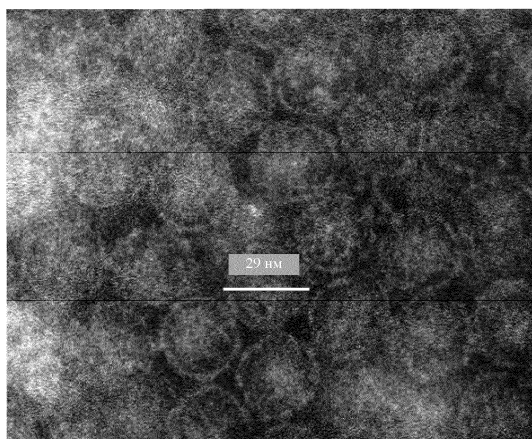
ii) введения указанной композиции субъекту по меньшей мере однократно для профилактики и/или лечения заболевания, как определено в любом из пп.1-13.



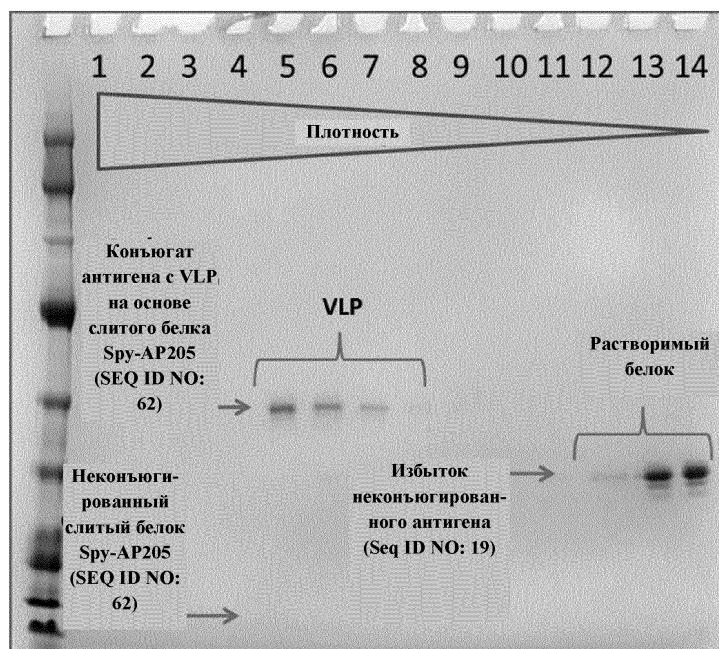
Фиг. 1



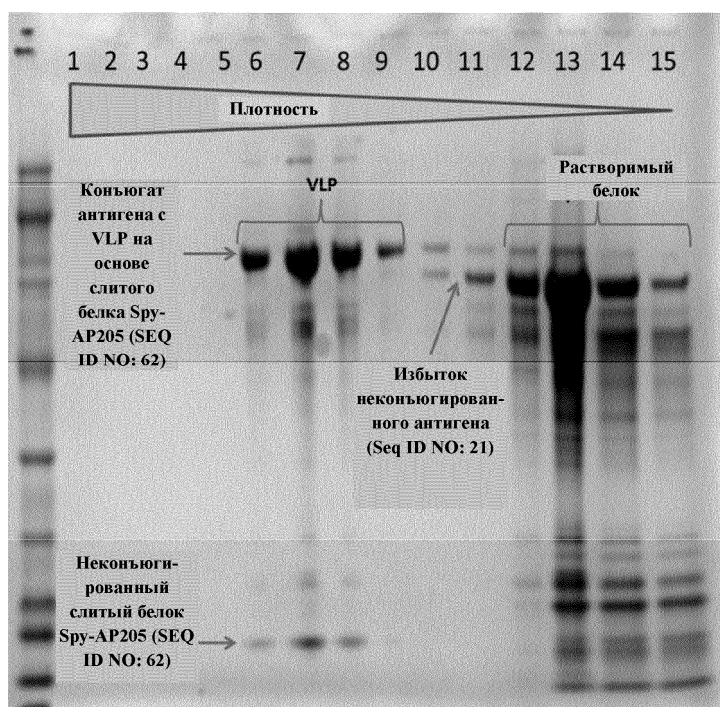
Фиг. 2



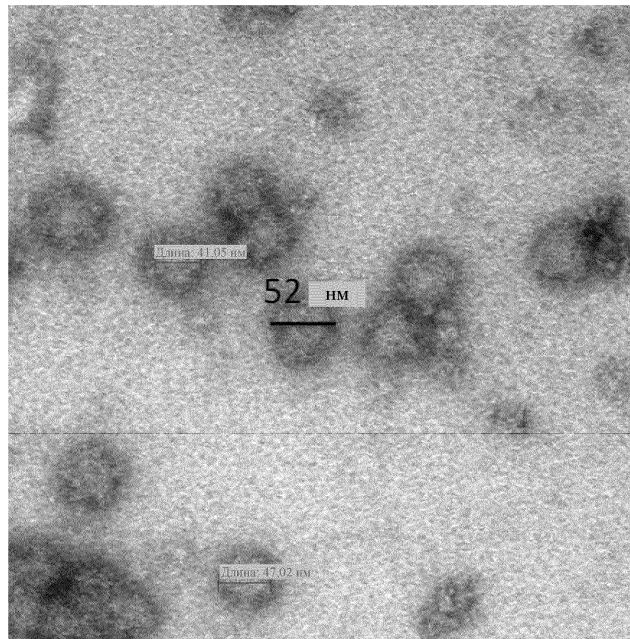
Фиг. 3



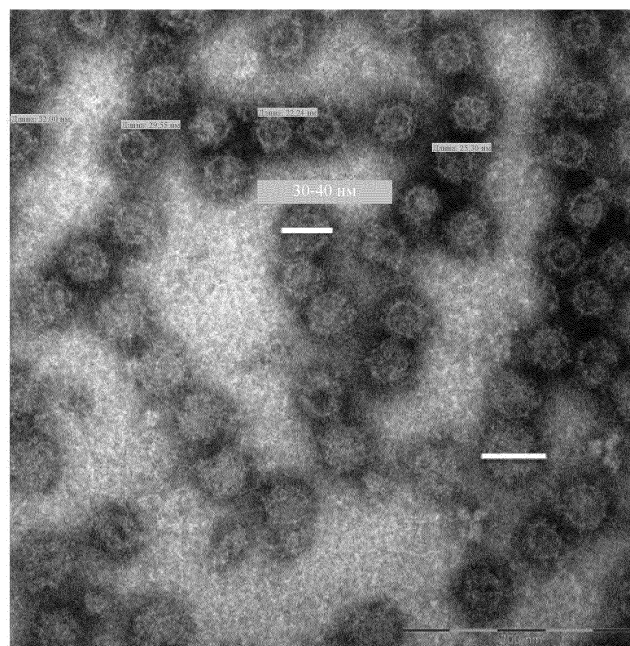
Фиг. 4А



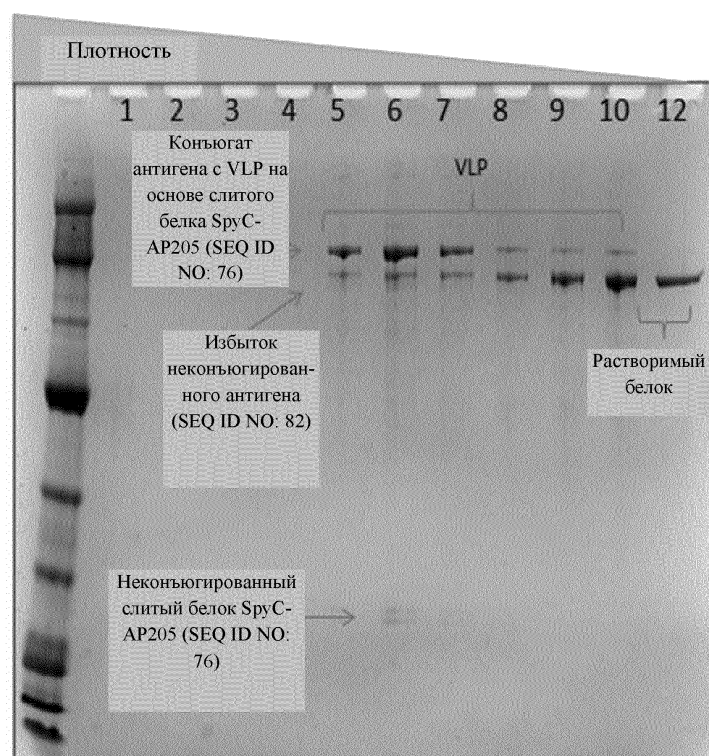
Фиг. 4В



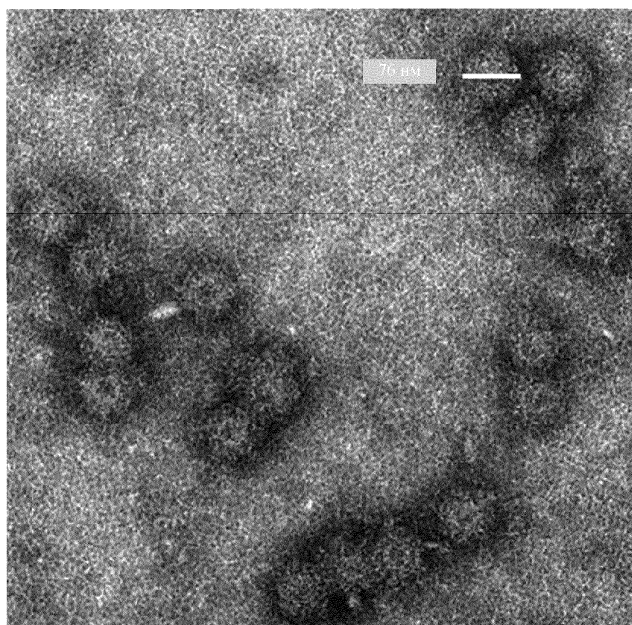
Фиг. 5



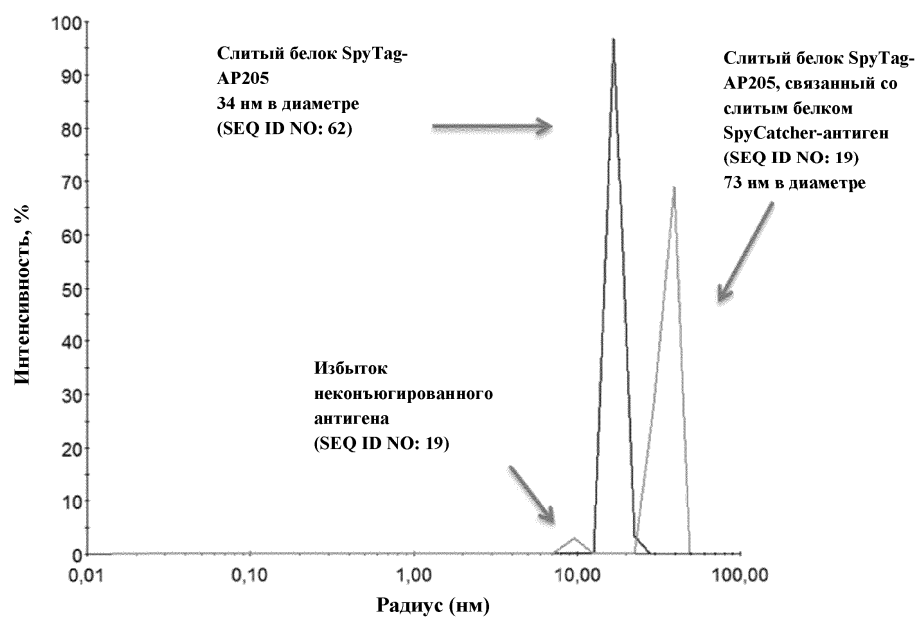
Фиг. 6



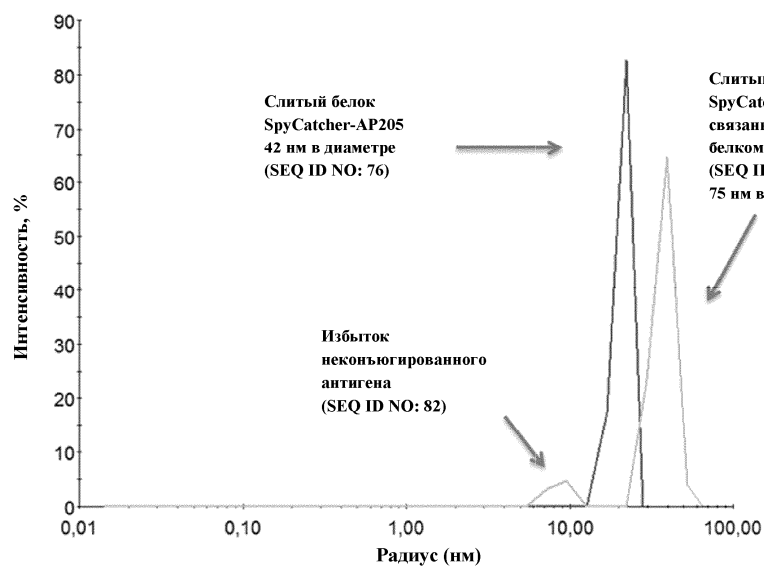
Фиг. 7



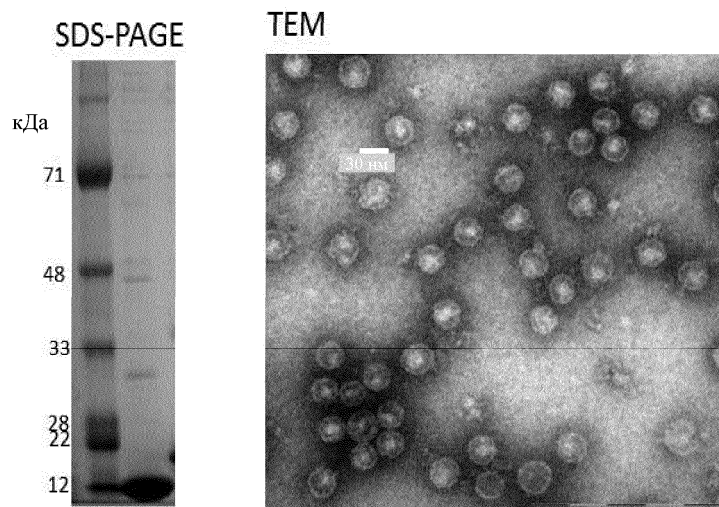
Фиг. 8



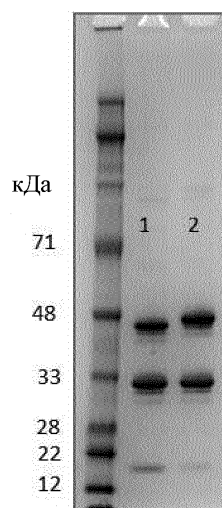
Фиг. 9



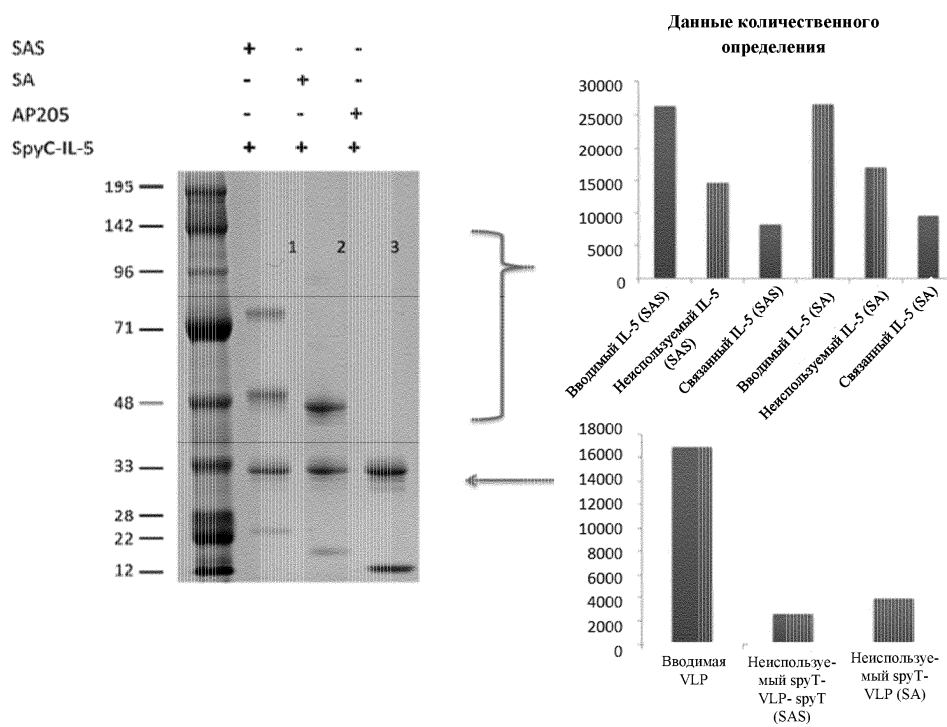
Фиг. 10



Фиг. 11



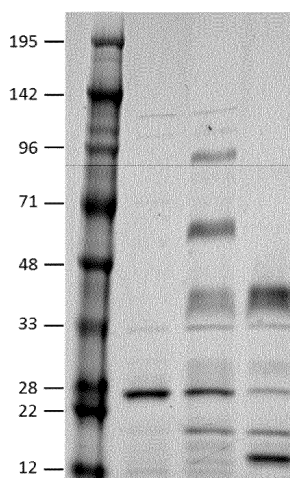
Фиг. 12



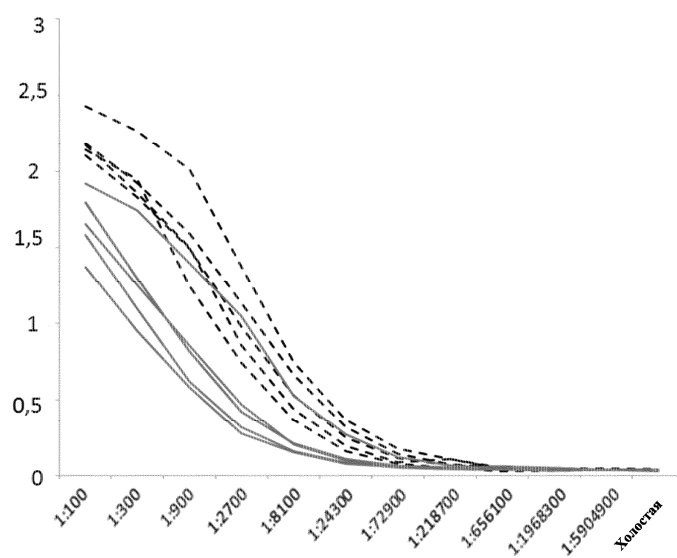
Фиг. 13

VLP c Pfs25

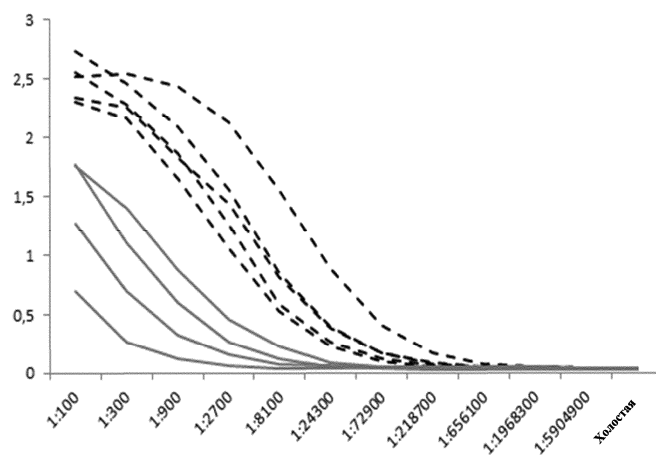
SpyT-AP205-SpyT	+	+	-
SpyC-Pfs25	-	+	+
AP205	-	-	+



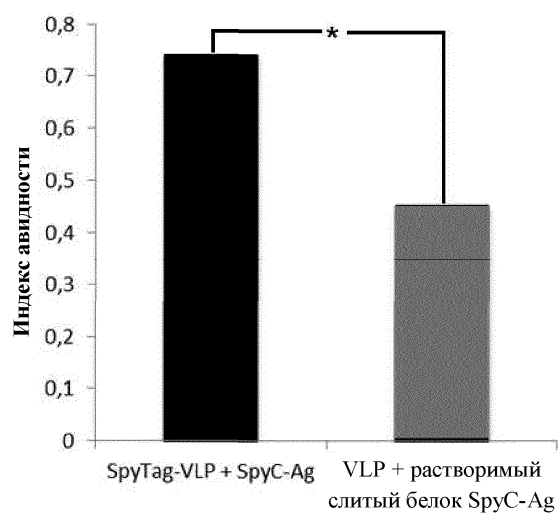
Фиг. 14



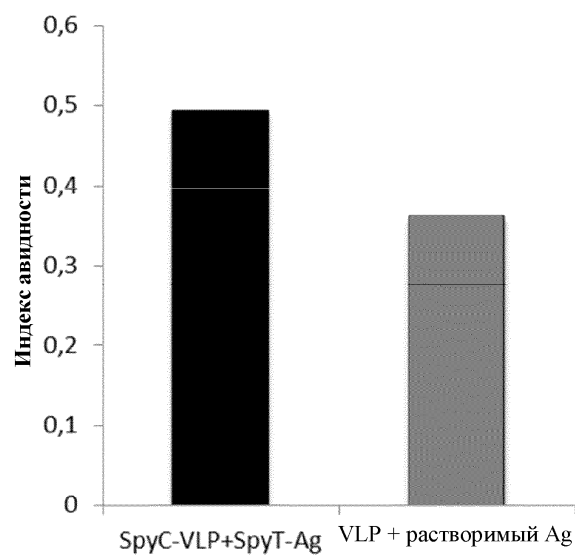
Фиг. 15



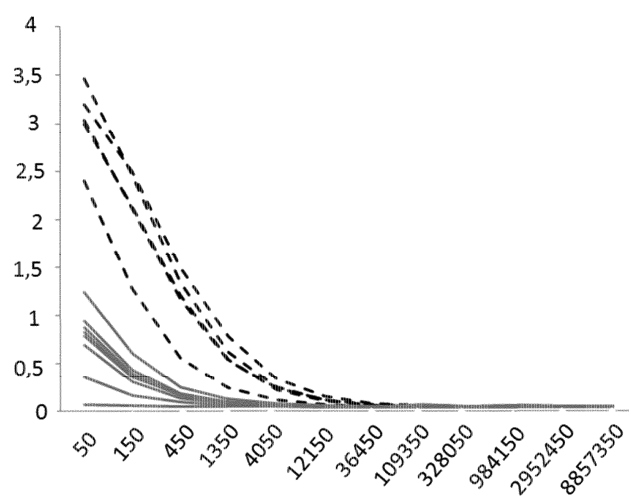
Фиг. 16



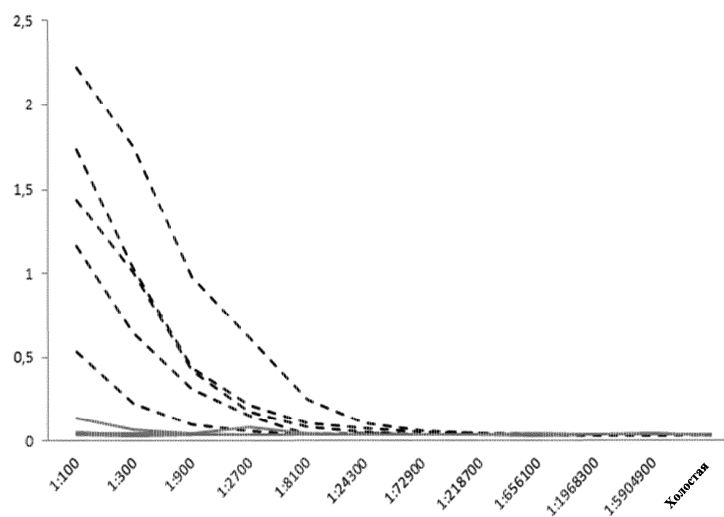
Фиг. 17



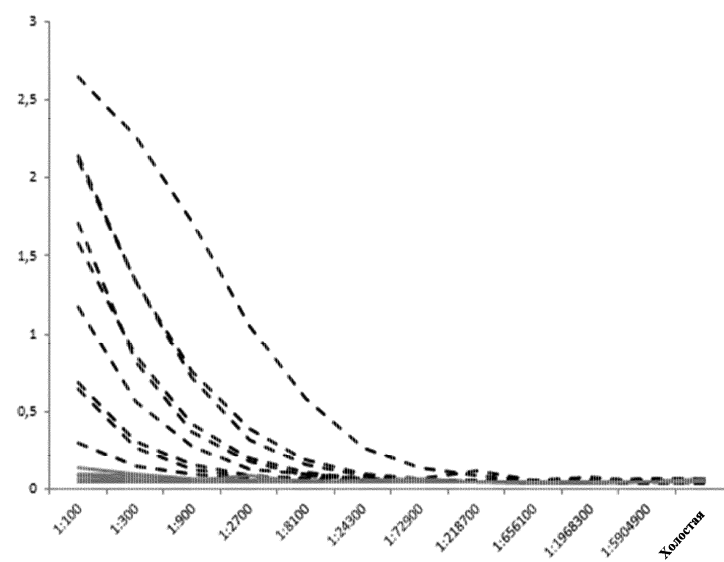
Фиг. 18



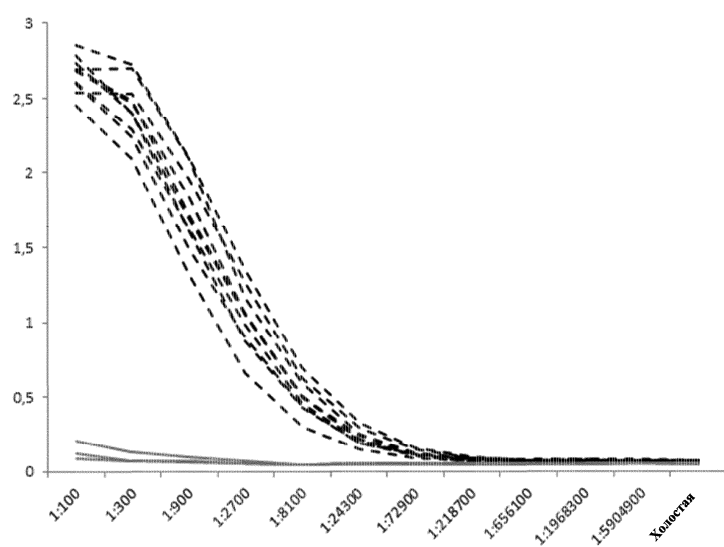
Фиг. 19



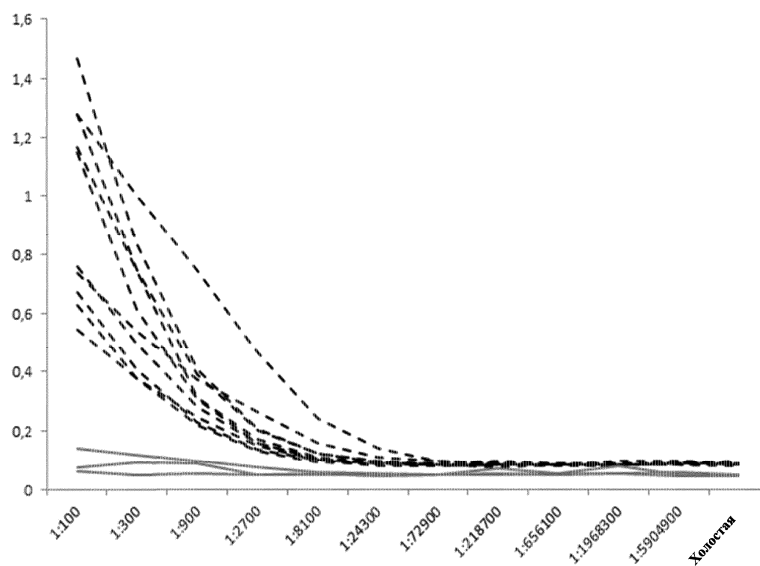
Фиг. 20



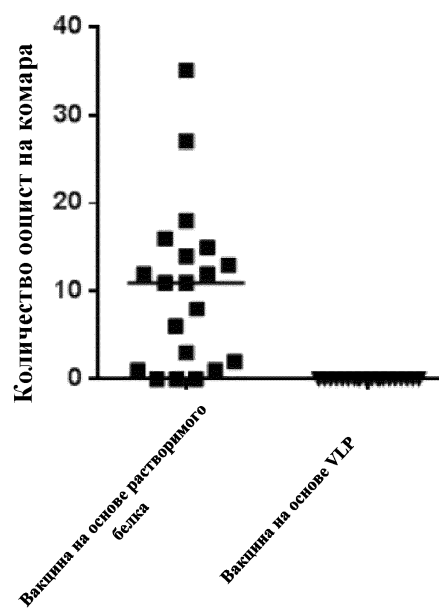
Фиг. 21



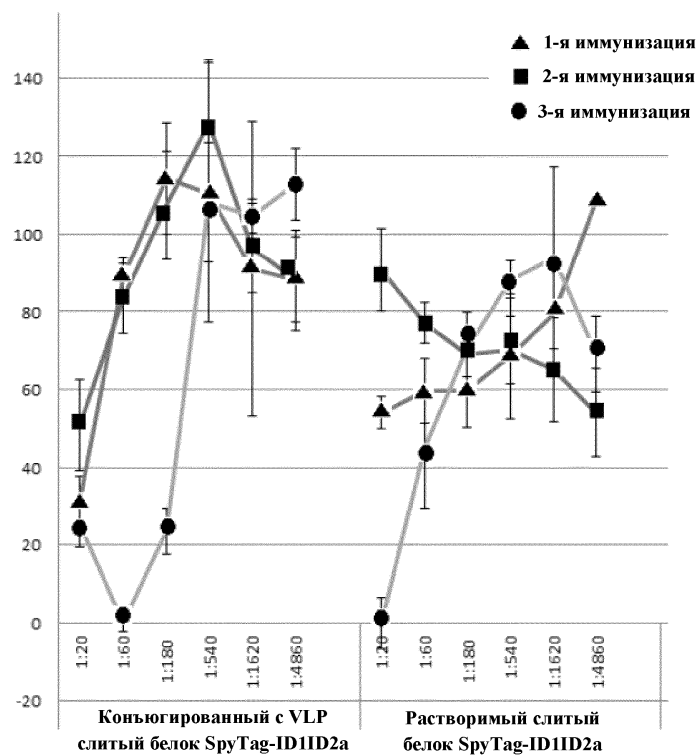
Фиг. 22



Фиг. 23



Фиг. 24



Фиг. 25

