(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента

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

2021.02.26

(21) Номер заявки

201691202

(22) Дата подачи заявки

2015.01.09

ФЛАГЕЛЛИН-СОДЕРЖАЩИЕ БЕЛКОВЫЕ НАНОЧАСТИЦЫ ДЛЯ иммуномодуляции

- (31) 14150600.6; 14189264.6
- (32) 2014.01.09; 2014.10.16
- (33) EP
- (43) 2017.01.30
- (86) PCT/EP2015/050289
- (87)WO 2015/104352 2015.07.16
- (71)(73) Заявитель и патентовладелец: АЛЬФА-О ПЕПТИДС АГ (СН)
- (72)Изобретатель:

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

(74) Представитель:

Нилова М.И. (RU)

(56) LIU GE ET AL.: "Immunogenicity and Efficacy of Flagellin-Fused Vaccine Candidates Targeting 2009 Pandemic H1N1 Influenza in Mice", PLOS ONE, vol. 6, no. 6, June 2011 (2011-06), XP002725576, ISSN: 1932-6203 the whole document

"Antigen YANG JINGYI ET AL.: replacement of domains D2 and D3 flagellin promotes mucosal IgA production and attenuates flagellin-induced inflammatory response after intranasal immunization", HUMAN VACCINES & IMMUNOTHERAPEUTICS, vol. 9, no. 5, May 2013 (2013-05), pages 1084-1092, XP002725577, the whole document

S. B. MIZEL ET AL.: "Flagellin as an Adjuvant: Cellular Mechanisms and Potential", THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 185, no. 10, 15 November 2010 (2010-11-15), pages 5677-5682, XP055066659, ISSN: 0022-1767, DOI: 10.4049/jimmunol.1002156, the whole document

H. ET of flagellin SALMAN HESHAM "Immunoadjuvant capacity mannosamine-coated poly(anhydride) nanoparticles in oral vaccination", VACCINE, vol. 27, no. 35, July 2009 (2009-07), pages 4784-4790, XP002725578, ISSN: 0264-410X, the whole document

WO-A1-2013144579

В изобретении предложены белковые наночастицы для иммуномодуляции, обладающие способностью самосборки, сконструированные из подходящих доменов олигомеризации и дополнительно включающие TLRS-связывающий белок флагеллин в качестве молекулы адъюванта. В настоящем изобретении также предложены композиция для иммуномодуляции, содержащая эффективное количество белковой наночастицы согласно настоящему изобретению, способ вакцинации человека, включающий введение белковой наночастицы согласно настоящему изобретению, и мономерный строительный блок для сборки наночастицы согласно настоящему изобретению.

Область техники

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

Уровень техники

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

Что касается объема настоящего изобретения, интересно отметить, что из множества различных рецепторов TLR, TLR5 является единственным белок-связывающим TLR, который консервативен у позвоночных от рыб до млекопитающих. TLR5 связывается с разобранной формой флагеллина филамента плетевидного жгутика из бета- и гамма-протеобактерий, которая отвечает за перемещение флагеллина. В результате недавних кристаллографических исследований обнаружили димерный комплекс между флагеллином и TLR5. После связывания флагеллина с TLR5, индуцируется MyD88-зависимый сигнальный путь, который, в свою очередь, активирует провоспалительный фактор транскрипции NF-kB в дендритных клетках, моноцитах и эпителиальных клетках, приводя, в конечном итоге, к врожденному иммунному ответу против жгутиковых бактерий.

Флагеллин имеет молекулярную архитектуру, которая состоит из четырех доменов D0, D1, D2 и D3. Белковая цепь начинается с N-концевой области домена D0 и образует большую петлю, проходящую через другие домены D1, D2 и D3, дойдя до кончика молекулы, указанная цепь поворачивает и уходит назад через D3, D2 и D1, при этом приводя ее C-концевую область в домене D0 в непосредственную близость к N-концевой области. Флагеллин способен активировать врожденную иммунную систему двумя путями. Первый путь заключается в связывании с рецептором TLR5, главным образом, через высоко консервативный участок его домена D1 (Yoon и др., см. ссылку выше.). Другой путь активации заключается во взаимодействии с инфламмасомой, главным образом, через высоко консервативный C-концевой участок его домена D0 (Lightfield K.L. и др., Nat Immunol, 2008, 9:1171-8).

Флагеллин применяли в качестве традиционного адъюванта, т.е. в качестве отдельного компонента, который вводят совместно с антигеном, или который также был разработан таким образом, чтобы содержать сам антиген в своей собственной молекулярной архитектуре. Второй подход обладает тем пре-имуществом, что эффект адъюванта колокализован с эффектом антигена, в результате чего дозировку адъюванта можно значительно уменьшить и, как следствие, побочные эффекты также можно значительно снизить.

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

Многие адъюванты обладают существенными ограничениями в своем применении в связи с их сильными побочными эффектами. К примеру, полный адъювант Фрейнда, который представляет собой очень сильный иммуностимулирующий состав, больше не может применяться даже в экспериментах на животных. В настоящее время существует лишь несколько одобренных адъювантов для применения в медицине, наиболее важными из которых являются квасцы. Одним из возможных способов уменьшения побочных эффектов системно применяемых адъювантов является их приготовление в виде дисперсной системы, т.е. включение адъювантов в аэрозоль или в масляную эмульсию, которые могут устранить побочные эффекты и сконцентрировать адъювант в непосредственной близости от представляющего интерес антигена. Таким образом, антиген и адъювант могут одновременно достигнуть одного и того же лимфоузла, увеличивая в результате эффект адъюванта при одновременном снижении системных побочных эффектов адъюванта.

Флагеллин, в частности, представляет собой адъювант, привлекательный для применения в белковых наночастицах, таких как те, которые описаны в публикации WO 2004/071493, поскольку флагеллин сам по себе является белком, в отличие от многих других адъювантов, которые представляют собой не-

большие молекулы, такие как имиквимод, или объекты, имеющие в основе нуклеиновую кислоту, такие как CpG. Поскольку флагеллин представляет собой белок, на его основе можно сконструировать наночастицу при помощи средств молекулярной биологии без необходимости использования химических сшивок.

Краткое описание изобретения

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

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

ND1 представляет собой белок, который образует олигомеры $(ND1)_{m}$ из m субъединиц ND1, ND2 представляет собой белок, который образует олигомеры $(ND2)_{n}$ из n субъединиц ND2,

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

L1 представляет собой связь или короткий гибкий линкер,

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

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

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

$$Y - ND3 - L2 - ND4 - Z \tag{II}$$

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

ND3 представляет собой белок, который образует олигомеры (ND3), из у субъединиц ND3,

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

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

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

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

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

Краткое описание фигур

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

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

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

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

- А) Модель флагеллина D0-D1-D2-D3 и соответствующая эпитоп-презентирующая наночастица.
- В) Модель флагеллина D0-D1-D2 и соответствующая эпитоп-презентирующая наночастица.
- С) Модель флагеллина D0-D1 и соответствующая эпитоп-презентирующая наночастица.
- D) Модель флагеллина D1-D2-D3 и соответствующая эпитоп-презентирующая наночастица.
- E) Модель В-клеточного эпитопа NANP (Z), слитого с доменом олигомеризации ND4 кора ND3-L2-ND4.

Фиг. 2: Схематическое изображение взаимодействия флагеллина с TLR5.

В идеале флагеллин должен быть димерным и располагаться в перевернутой ориентации на наночастицах. Представляемая часть белковых цепей начинается с (например, пентамерного) домена олигомеризации ND1, который присоединен к (например, димерному) домену олигомеризации ND2 при помощи линкера L, дополнительно соединенного с производным флагеллина FLA, состоящего из D2, и далее домена D1 флагеллина до кончика (Т) включительно. На кончик присоединяют последовательность D1, которая укладывается сама на себя и в домен D2. Для наглядности наиболее вероятно, разупорядоченные, гистидиновые метки не представлены.

А) Слева: Модель мономера.

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

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

Фиг. 3: Карта вектора рРЕР-Т.

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

Фиг. 4: Микроизображения белковых наночастиц в просвечивающем электронном микроскопе

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

- A) T81C-WRW-8RRVRA-D0-D1: T81c-WRW-8RRVRA-T1BT* соотношение совместной сборки 12:48, описано в разделе "Разработка FLA-SAPN" и примере 6. Отрезок отображает 500 нм.
 - В) Т81с-8-D0-D1: Т81с-8-Pf соотношение совместной сборки 3:57, описано в примере 8.

Отрезок отображает 200 нм.

- C) PD52-2i88-PANDORA-D2-D1-ori: PD52-2i88-PANDORA-Noro соотношение совместной сборки 5:55, описано в примере 7. Отрезок отображает 200 нм.
- D) DIM-D0-D1 : DIM-D2-D1-tip3_NIC-pept соотношение совместной сборки 5:55, описано в примере 9. Отрезок отображает 200 нм.

Фиг. 5: ДСН-ПААГ-электрофорез конструкции LONG-D2-D1-огі примеров 1 и 5.

Данная конструкция обладает теоретической молекулярной массой 41,1 кДа

CL - очищенный лизат

FT - проба после колонки

1 - рН 8,0 промывка с 10 мМ имидазола

2 - pH 8,0 промывка с 500 мМ NaH₂PO₄

3 - рН 6,3 промывка

4 - рН 5,9 промывка

5 - рН 4,5 промывка

Elu - элюирование 250 мМ имидазола, 5 и 10 мкл образца нанесено на гель.

Фиг. 6: Микроизображения в просвечивающем электронном микроскопе белковых наночастиц конструкции LONG-D2-D1-ori при различных разрешениях

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

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

Фиг. 7: Активация клеточного пути TLR5.

A) Long-D2-D1-ori (пример 5)

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

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

Верхние вставки: оценка чувствительной к дозе активности

Нижние вставки: оценка ЕС50

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

Ось Х: Концентрация (нг/мл) наночастицы

Ось Ү: экспрессия SEAP (нг/мл) или % А=% активности

Фиг. 8: ИФА-анализ связывания титров антитела после иммунизации мышей С57ВІ/6 (описано в примерах 8 [вставка А] и 9 [вставка Б]).

A)

- Отдельно Т81с-8-Pf в дозе 1 мкг
- ♦ Отдельно Т81с-8-Pf в дозе 10 мкг

X Совместная сборка Т81с-8-D0-D1 и Т81с-8-Pf в соотношении 3:57 и дозе 1 мкг

- ▲ Совместная сборка Т81с-8-D0-D1 и Т81с-8-Pf в соотношении 3:57 и дозе 10 мкг
- Совместная сборка Т81с-8-D0-D1 и Т81с-8-Pf в соотношении 9:51 и дозе 1 мкг

Ж Совместная сборка T81c-8-D0-D1 и T81c-8-Pf в соотношении 9:51 и дозе 10 мкг

Ось Х: коэффициент разбавления сыворотки

Ось Y: OD = оптическая плотность

Планшет ИФА покрывают полным иммуногеном, применяемым для иммунизации В)

• Совместная сборка DIM-D0-D1 и DIM-D2-D1-tip3 NIC-pept в соотношении 5:55 и дозе

10 mki

■ Никотин, соединенный с носителем гемоцианином фиссуреллы в дозе 10 мкг

Ось Х: коэффициент разведения сыворотки

Ось Y: OD = оптическая плотность

Планшет ИФА покрывают только никотином, прикрепленным к несвязанному носителю

Фиг. 9: Микроизображения в просвечивающем электронном микроскопе белковых наночастиц конструкции Nic-DEDDL

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

Фиг. 10: Образование антител

Иммунизацию групп из трех мышей C57BI/6 осуществляли подкожно либо 10 мкг Nic-DEDDL (пример 10), либо 10 мкг Nic-KLH (никотин, соединенный с носителем гемоцианином фиссуреллы) в качестве положительного контроля тремя инъекциями каждой с интервалом в неделю. Титр антител в нулевой день (т.е. до первой инъекции) и далее неделю спустя после каждой инъекции определяли при помощи $И\Phi A$. D = количество дней после первой иммунизации; A = титр антитела (логарифмическая шкала Iog_2).

Подробное описание изобретения

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

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

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

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

ND1 представляет собой белок, который образует олигомеры $(ND1)_m$ из m субъединиц ND1, ND2 представляет собой белок, который образует олигомеры $(ND2)_n$ из n субъединиц ND2,

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

L1 представляет собой связь или короткий гибкий линкер,

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

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

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

$$Y - ND3 - L2 - ND4 - Z \tag{II}$$

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

ND3 представляет собой белок, который образует олигомеры $(ND3)_y$ из у субъединиц ND3, ND4 представляет собой белок, который образует олигомеры $(ND4)_z$ из z субъединиц ND4,

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

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

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

быть идентичен L1, и

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

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

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

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

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

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

MAQVINTNSLSLLTQNNLN**R**SQSALGTAIERLSSGLRINSA**R**DDAAGQAIANRFTANI**R**G LTQASRNANDGISIAQTTEGALNEINNNLQRVRELAVQSANSTNSQSDLDSIQAEITQRL NEIDRVSGQTQFNGV**R**VLAQDNTLTIQVGANDGETIDIDL**R**QINSQTLGLDQLNVQQ**KY KDGDKGDDK**TENPLQ**R**IDAALAQVDALRSDLGAVQNRFNSAITNLGNTVNNLSEARSR IEDSDYATEVSNMSRAQILQQAGTSVLAQANQVPQNVLSLLR (SEQ ID Nº: 28)

Дополнительно, в объем настоящего изобретения включено конструирование флагеллина в виде димера на наночастице. Таким образом, оптимизировано взаимодействие с TLR5, который также является димером. Этого легко достигнуть посредством применения димерного домена олигомеризации белка, такого как ND1 (m равен 2) или ND2 (n равен 2), и его применения в качестве сайта присоединения для производного флагеллина FLA, т.е. как это показано в формуле (Ib) или (Ia) соответственно. Это принудительно переводит производное флагеллина в димерную форму, которая более легко взаимодействует с TLR5 (фиг. 2). Предпочтительно, чтобы в такой конструкции димерный домен олигомеризации в строительном блоке согласно формуле (Ia) или (Ib), к которому присоединен флагеллин (либо ND2 в формуле (Ia), либо ND1 в формуле (Ib)), отличался от соответствующего домена олигомеризации в строительном

блоке согласно формуле (II) (либо ND4 при совместной сборке с цепями согласно формуле (Ia), либо ND3 при совместной сборке с цепями согласно формуле (Ib)). Предпочтительно димерный домен олигомеризации в строительном блоке согласно формуле (Ia) или (Ib) обладает более сильным взаимодействием, т.е. способностью к формированию димера, чем соответствующий домен олигомеризации (ND3 или ND4) в строительном блоке согласно формуле (II). Это обеспечивает гарантию того, что в совместно собранной наночастице со строительными блоками согласно формуле (Ia) или (Ib) и формуле (II) флагеллин или производное флагеллина FLA всегда образует димер на смежных строительных блоках согласно формуле (Ia) или (Ib), и не распределен в качестве одиночного мономера по всей совместно собранной наночастице.

Кроме того, посредством конструирования флагеллина в перевернутой ориентации преимущественно в виде димера на наночастице можно оптимизировать взаимодействие с димером TLR5 (фиг. 2). Такая наночастица является предпочтительной. Например, конструкцию флагеллина D1-D2 можно сконструировать посредством соединения белковых цепей с пептидной последовательностью подобной KAKKDGKDDKDS (SEQ ID №: 29, "Т" в фиг. 2) на стыке между доменом D0 и D1, таким образом минуя домен D0, и полного удаления домена D3 без воссоединения белковых цепей. Следовательно, у образующейся в результате молекулы флагеллина N- и C-концы будут располагаться в области D2 с образованием последовательности, подобной

SARLSDLEANNAVRGESKITVNGAEYTANATGDRITLAGRTMFIDRTASGVSTLINEDA AAARRSTANPLASIDSALSRVDAVRSSLGAIQNRFDSA<u>KAKKKDGKDDKDS</u>KNANDGI SIAQTTEGALNEINNNLQRVRELSVQATNGTNSDSDLRSIQDEIQQRLEEIDRVSNQTQFN GVKVLSQDNQMKIQVGAKDGETITIDLQKIDVKSLGLDGFNVNGPREATVGDLRSSFRN VTGYDTYAAGADRYRVDINSGAV (SEQ ID №30)

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

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

Мономерные строительные блоки

Пептид (или полипептид, или белок) представляет собой цепь или последовательность аминокислот, ковалентно связанных амидными связями. Пептид может быть природным, природным модифицированным, частично синтетическим или полностью синтетическим. Природные модифицированные, частично синтетические или полностью синтетические понимают в том значении, что они не встречаются в природе. Термин аминокислота одновременно охватывает встречающиеся в природе аминокислоты, выбранные из 20 незаменимых α-L-аминокислот, синтетических аминокислот, таких как α-D-аминокислоты, 6-аминогексановая кислота, норлейцин, гомоцистеин или подобные им, также, как и встречающиеся в природе аминокислоты, которые некоторым образом модифицировали для изменения некоторых свойств, таких как заряд, такие как фосфосерин или фосфотирозин или другие модификации, такие как н-октаноил-серин, или подобные им. У производных аминокислот аминогруппа, формирующая амидную связь, является алкилированной, или боковая цепь амино-, гидрокси или тиогруппы является алкилированной или ацилированной, или боковая цепь карбоксигруппы является амидированной или этерифицированной. Предпочтительно, белок согласно настоящему изобретению содержит аминокислоты, выбранные из 20 незаменимых природных α-L-аминокислот.

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

Короткую подвижную линкерную цепь L1 или L2 выбирают из необязательно замещенных атомов углерода, необязательно замещенных атомов азота, атомов кислорода, атомов серы и их комбинаций, с предпочтительно 1 до 60 атомами, в частности, содержащих от 1 до 20 атомов в цепи. Такая короткая

подвижная линкерная цепь представляет собой, к примеру, цепь полиэтиленокси, гибкую сахарную цепь или, предпочтительно, гибкую пептидную цепь, к примеру, пептидную цепь, состоящую из 1 до 20 аминокислот, в частности, от 1 до 6 аминокислот, содержащую одну или нескольких аминокислот глицина. Наиболее предпочтительные линкеры состоят из 1 до 6 аминокислот с высоким содержанием глицина.

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

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

Домены олигомеризации, которые не являются суперспиралями, представляют собой, к примеру, домен тримеризации (фолдон) белка фибритина бактериофага Т4 (Тао, Ү. и др., Structure 1997, 5: 789-798).

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

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

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

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

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

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

Архитектура строительного блока согласно формуле (Ia), (Ib) или (II) явно отличается от вирусных капсидных белков. Вирусные капсиды состоят либо из одного единственного белка, который образует 60 олигомеров или числа ему кратного, как, к примеру, частицы вируса гепатита В (EP 1 262 555, EP 0 201 416), или более, чем их одного белка, который подвергается процессу совместной сборки с образованием структуры вирусного капсида, который может принимать и другие геометрические формы, отличные от икосаэдра в зависимости от типа вируса (Fender P. и др., Nature Biotechnology 1997, 15: 52-56). Белковые

наночастицы, обладающие способностью самосборки (SAPN), согласно настоящему изобретению также явно отличаются от вирусоподобных частиц, так как они (a) сконструированы из других белков, отличных от вирусных капсидных белков, и (б) полость в середине наночастицы слишком мала для того, чтобы разместить ДНК/РНК полного вирусного генома.

Домены олигомеризации белка хорошо известны (Burkhard P. и др., Trends Cell Biol 2001, 11:82-88). База данных структуры белка RCSB-PDB (http://www.rcsb.org/) содержит атомные структуры белков. Данный веб-сайт предлагает инструменты для идентификации белковых олигомеров среди таких атомных структур. Применение режима расширенного поиска (http://www.rsb.org/pdb/search/advSearch.do) с классификатором "A5" в "Protein Stoichiometry" выгружает пентамерные домены олигомеризации белка. Применение режима расширенного поиска с классификатором "Coiled coil proteins" в "SCOP classification Browser" выгружает суперспиральные домены олигомеризации белка. Объединение двух режимов поиска выгружает все пентамерные суперспиральные белковые структуры в базе данных. Точно так же, димерные, тримерные или тетрамерные суперспиральные структуры можно получить, применяя соответственно "А2", "А3" или "А4" в качестве классификаторов. В настоящем изобретении домены олигомеризации ND1, ND2, ND3 и ND4 предпочтительно представляют собой суперспиральные домены. Суперспираль представляет собой белковую последовательность с непрерывной структурой в основном гидрофобных остатков с интервалом в 3 и 4 остатка, обычно в последовательности из семи аминокислот (гептадный повтор) или одиннадцати аминокислот (ундекадный повтор), которая организуется (сворачивается) для образования мультимерной группы спиралей. Также предполагаются суперспирали с последовательностями, включающими некоторые неравномерное распределение расположенных 3 и 4 остатков. Гидрофобные остатки представляют собой в частности гидрофобные аминокислоты Val, Ile, Leu, Met, Туг, Рhe и Тгр. В основном гидрофобный означает, что по меньшей мере 50% остатков должны быть выбраны из указанных гидрофобных аминокислот.

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

```
 [aa(a)-aa(b)-aa(c)-aa(d)-aa(e)-aa(f)-aa(g)]_X \qquad \qquad (IIIa), \\ [aa(b)-aa(c)-aa(d)-aa(e)-aa(f)-aa(g)-aa(a)]_X \qquad \qquad (IIIb), \\ [aa(c)-aa(d)-aa(e)-aa(f)-aa(g)-aa(a)-aa(b)]_X \qquad \qquad (IIIc), \\ [aa(d)-aa(e)-aa(f)-aa(g)-aa(a)-aa(b)-aa(c)]_X \qquad \qquad (IIId), \\ [aa(e)-aa(f)-aa(g)-aa(a)-aa(b)-aa(c)-aa(d)]_X \qquad \qquad (IIIe), \\ [aa(f)-aa(g)-aa(a)-aa(b)-aa(c)-aa(d)-aa(e)]_X \qquad \qquad (IIIf), \\ [aa(g)-aa(a)-aa(b)-aa(c)-aa(d)-aa(e)-aa(f)]_X \qquad \qquad (IIIg), \\ [aa(g)-aa(a)-aa(b)-aa(e)-aa(g)-aa(g)-aa(g)-aa(g)-aa(g)-aa(g)-aa(g)-aa(g)-aa(g)-aa(g)-aa(g)-aa(g)-aa(g)-aa(g)-aa(g)-aa(g)-aa(g)-aa(g)-aa(g)-aa(g)-aa(g)-aa(g)-aa(g)-aa(g)-aa(g)-aa(g)-aa(g)-aa(g)-aa(g)-aa(g)-aa(g)-aa(g)-aa(g)-aa(g)-aa(g)-aa(g)-aa(g)-aa(g)-aa(g)-aa(g)-aa(g)-aa(g)-aa(g)-aa(g)-aa(g)-aa(g)-aa(g)-aa(g)-aa(g)-aa(g)-aa(g)-aa(g)-aa(g)-aa(g)-aa(g)-aa(g)-aa(g)-aa(g)-aa(g)-aa(g)-aa(g)-aa(g)-aa(g)-aa(g)-aa(g)-aa(g)-aa(g)-aa(g)-aa(g)-aa(g)-aa(g)-aa(g)-aa(g)-aa(g)-aa(g)-aa(g)-aa(g)-aa(g)-aa(g)-aa(g)-aa(g)-aa(g)-aa(g)-aa(g)-aa(g)-aa(g)-aa(g)-aa(g)-aa(g)-aa(g)-aa(g)-aa(g)-aa(g)-aa(g)-aa(g)-aa(g)-aa(g)-aa(g)-aa(g)-aa(g)-aa(g)-aa(g)-aa(g)-aa(g)-aa(g)-aa(g)-aa(g)-aa(g)-aa(g)-aa(g)-aa(g)-aa(g)-aa(g)-aa(g)-aa(g)-aa(g)-aa(g)-aa(g)-aa(g)-aa(g)-aa(g)-aa(g)-aa(g)-aa(g)-aa(g)-aa(g)-aa(g)-aa(g)-aa(g)-aa(g)-aa(g)-aa(g)-aa(g)-aa(g)-aa(g)-aa(g)-aa
```

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

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

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

- (1) белок согласно любой из Формул (IIIa) до (IIIg), при этом х равен 3, а аа(a) и аа(d) выбраны из 20 природных α-L-аминокислот таким образом, чтобы сумма баллов из табл. 1 для данных 6 аминокислот составляла по меньшей мере 14, и такие белки, содержащие вплоть до 17 дополнительных гептадов; или
- (2) белок согласно любой из формул (IIIa) до (IIIg), при этом х равен 3, а аа(а) и аа(d) выбраны из 20 природных α-L-аминокислот таким образом, чтобы сумма баллов из табл. 1 для данных 6 аминокислот составляла по меньшей мере 12 при условии, что одна аминокислота аа(а) представляет собой заряженную аминокислоту, способную образовывать внутриспиральный солевой мостик к аминокислоте аа(d) или аа(g) соседнего гептада, или что одна аминокислота аа(d) представляет собой заряженную аминокислоту, способную образовывать внутриспиральный солевой мостик к аминокислоте аа(а) или аа(е) соседнего гептада, и такие белки, содержащие вплоть до двух дополнительных гептадов. Заряженная аминокислота, способная образовывать внутриспиральный солевой мостик к аминокислоте соседнего гептада, представляет собой, к примеру, Аѕр или Glu, если другая аминокислота представляет собой Lys, Arg или His, или наоборот.

Таблица 1. Баллы аминокислот для определения предпочтительности

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

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

- (11) Белок согласно любой из формул (IIIa) до (IIIg), при этом aa(a) выбран из Val, Ile, Leu и Met и их производных, и aa(d) выбран из Leu, Met, Val и Ile и их производных.
- (12) Белок согласно любой из формул (IIIa) до (IIIg), при этом один аа(a) представляет собой Asn и другие аа(a) выбраны из Asn, Ile и Leu, и аа(d) представляет собой Leu. Такой белок обычно представляет собой домен димеризации.
- (13) Белок согласно любой из формул (IIIa) до (IIIg), при этом aa(a) и aa(d), оба, представляют собой Leu или оба Ile. Такой белок обычно представляет собой домен тримеризации.
- (14) Белок согласно любой из формул (IIIa) до (IIIg), при этом aa(a) и aa(d), оба, представляют собой Trp. Такой белок обычно представляет собой домен пентамеризации.
- (15) Белок согласно любой из формул (IIIa) до (IIIg), при этом aa(a) и aa(d), оба, представляют собой Phe. Такой белок обычно представляет собой домен тетрамеризации.
- (16) Белок согласно любой из формул (IIIa) до (IIIg), при этом aa(a) и aa(d), оба, представляют собой либо Trp, либо Phe. Такой белок обычно представляет собой домен пентамеризации.
- (17) Белок согласно любой из формул (IIIa) до (IIIg), при этом aa(a) представляет собой либо Leu, либо Ile, и один aa(d) представляет собой Gln, и другие aa(d) выбраны из Gln, Leu и Met. Такой белок обладает способностью представлять собой домен пентамеризации.

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

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

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

В более предпочтительном мономерном строительном блоке согласно формуле (Ia), (Ib) или (II),

ND1, ND2, ND3 и ND4 представляют собой белки, которые содержат по меньшей мере одну последовательность длиной в три гептад-повтора, которую прогнозируют при помощи программы прогнозирования суперспиралей PCOILS для образования суперспирали с вероятностью более, чем 0,9 для всех ее аминокислот с, по меньшей мере, с размерами одного из окон в 14, 21, или 28.

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

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

В еще одном предпочтительном варианте реализации один домен олигомеризации ND1, ND2, ND3 или ND4 представляет собой домен тримеризации (фолдон) белка фибритина бактериофага Т4 (Тао, Ү. и др., Structure 1997, 5:789-798.) или его производное. Данный домен тримеризации имеет последовательность GYIPEAPRDGQAYVRKDGEWVLLSTFL (SEQ ID №: 3). Небольшие модификации данного домена также предусмотрены.

Белковые наночастицы, обладающие способностью самосборки: НОК единицы

Белковые наночастицы, обладающие способностью самосборки (SAPN), образуются из мономерных строительных блоков согласно Формуле (Ia), (Ib) или смеси мономерных строительных блоков согласно формуле (II) или (Ib) с мономерными строительными блоками согласно формуле (II). Если собираются такие строительные блоки, они образуют так называемые НОК (LCM) единицы. Число мономерных строительных блоков, которые будут собираться в такую НОК единицу, будет определяться наименьшим общим кратным (HOK). Следовательно, если, к примеру, домены олигомеризации мономерного строительного блока образуют пентамер (ND1) $_5$ (m = 5) и димер (ND2) $_2$ (n = 2), то 10 мономеров будут образовывать НОК единицу. Если линкерный сегмент L обладает приемлемой длиной, данная НОК единица может собраться в виде сферической белковой наночастицы.

Белковые наночастицы, обладающей способностью самосборки (SAPN), могут самоорганизовываться посредством сборки только одной или более одной НОК единиц (табл. 2). Такие SAPN представляют собой топологически замкнутые структуры.

Правильные многогранники

Существует пять правильных многогранников, тетраэдр, куб, октаэдр, додекаэдр и икосаэдр. Они обладают различными элементами внутренней вращательной симметрии. Тетраэдр обладает одной осью второго порядка и двумя осями третьего порядка, куб и октаэдр обладают осями вращательной симметрии второго, третьего и четвертого порядка, додекаэдр и икосаэдр обладают осями вращательной симметрии второго, третьего и пятого порядка. В кубе пространственная ориентация этих осей является точно такой же, как и в октаэдре, и также в додекаэдре и икосаэдре пространственная ориентация данных осей относительно друг друга является в точности одинаковой. Следовательно, для целей SAPN согласно настоящему изобретению додекаэдр и икосаэдр можно рассматривать как будучи идентичными. Додекаэдр/икосаэдр построен из 60 идентичных трехмерных строительных блоков (табл. 2). Данные строительные блоки являются асимметричными единицами (AUs) многогранника. Они представляют собой пирамиды и грани пирамиды соотносятся с одной из осей вращательной симметрии, следовательно, данные AUs будут нести на своих гранях элементы симметрии второго, третьего и пятого порядка. Если данные элементы симметрии образуются из доменов олигомеризации белка, то такие AUs конструируются из мономерных строительных блоков, как описано выше. Достаточно выравнить два домена олигомеризации ND1 и ND2, или ND3 и ND4 вдоль двух осей симметрии AU. Если два данных домена олигомеризации образуют стабильные олигомеры, то будет автоматически образовываться граница раздела симметрии вдоль третьей оси симметрии, и ее можно стабилизировать посредством оптимизации взаимодействий вдоль данной границы раздела, к примеру, гидрофобных, гидрофильных или ионных взаимодействий, или ковалентных связей, таких как дисульфидные мостики.

Таблица 2. Возможные комбинации состояний олигомеризации в формировании правильных многогранников

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

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

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

Будут ли НОК единицы также подвергаться сборке с образованием правильного многогранника, состоящего из более одной НОК единицы, зависит от геометрического расположения двух доменов олигомеризации ND1 и ND2 или ND3 и ND4 по отношению друг к другу, особенно от угла между осями вращательной симметрией двух доменов олигомеризации. В основном данный процесс управляется посредством і) взаимодействия между соседними доменами в наночастице, іі) длины линкерного сегмента L, ш) формы индивидуальных доменов олигомеризации. Данный угол больше в НОК единицах по сравнению с размещением в правильном многограннике. Кроме того, данный угол не идентичен в мономерных строительных блоках в отличие от правильного многогранника. Если этот угол ограничен меньшими значениями правильного многогранника (с помощью привлекательных гидрофобных, гидрофильных или ионных взаимодействий, или ковалентного дисульфидного мостика между двумя доменами олигомеризации) и линкерный сегмента L является достаточно коротким, то данное число НОК единиц, каждая из которых содержит определенное количество мономерных строительных блоков, будет далее дополнительно отжигаться для того, чтобы образовать правильный многогранник (табл. 2), или включать больше мономерных строительных блоков для образования наночастиц, у которых отсутствует строгая внутренняя симметрия многогранника.

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

Предпочтительно, чтобы антигены, которые состоят из флагеллин-содержащих наночастиц, могли представлять собой или В-клеточные эпитопы и/или Т-клеточные эпитопы, и быть выбранными из группы, состоящей из (а) белков или пептидов, подходящих для индуцирования иммунной реакции против раковых клеток; (б) белков, пептидов или углеводов, подходящих для индуцирования иммунной реакции против инфекционных заболеваний; (в) белков или пептидов, подходящих для индуцирования иммунной реакции против аллергенов; (г) белковых или пептидных гормонов, подходящих для индуцирования иммунной реакции для лечения заболевания человека; и (д) молекул гаптенов, подходящих для индуцирования иммунной реакции для лечения зависимостей или других расстройств. Белковые наночастицы, содержащие такие белки, их пептидные фрагменты, пептиды, углеводы или гаптены могут являться подходящими для индуцирования иммунной реакции у людей, или также у сельскохозяйственных и домашних животных.

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

В ином аспекте настоящее изобретение относится к композиции, содержащей белковую наночастицу как описано в настоящем описании. Такая композиция является особенно подходящей в качестве вакцины. Предпочтительные вакциные композиции содержат белковую наночастицу в водном буферном растворе и могут дополнительно содержать, к примеру, вспомогательные вещества, полученные из Сахаров (такие как глицерол, трегалоза, сахароза или подобные им) или вспомогательные вещества, полученные из аминокислот (такие как аргинин, пролин, глутамат или подобные им), или анионные, катионные, неионные или твиттер-ионные детергенты (такие как холат, дезоксихолат, твин или подобные им), или любой вид соли (такой как NaCl, MgCl₂ или подобные им) для регуляции ионной силы раствора.

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

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

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

T81c-WRW-8RRVRA-D0-D1 (FLJB SALTY)(FLA-SAPN-1a) в соответствии с формулой (Ia)

MGHHHHHASWRWDGGLVPRGSWQTWNARWDQWSNDWNAWRSDWQAWR
DDWARWRALWMGGRLLLRLEELERRLEELERRLEELERFVAAWTLRVRALERR
LEELERRIEEIARGMAQVINTNSLSLLTQNNLNKSQSALGTAIERLSSGLRINSAKD
DAAGQAIANRFTANIKGLTQASRNANDGISIAQTTEGALNEINNNLQRVRELAVQ
SANSTNSQSDLDSIQAEITQRLNEIDRVSGQTQFNGVKVLAQDNTLTIQVGANDG
ETIDIDLKQINSQTLGLDSLNVHGAPVDPASPWTENPLQKIDAALAQVDALRSDL
GAVQNRFNSAITNLGNTVNNLSEARSRIEDSDYATEVSNMSRAQILQQAGTSVLA
QANQVPQNVLSLLR (SEQ ID №:4)

T81c-WRW-8RRVRA-T1BT* (FLA-SAPN-2) в соответствии с Формулой (II) MGHHHHHHASEYLNKIQNSLSTEWSPSSVTGSWQTWNARWDQWSNDWNAWR SDWQAWRDDWARWRALWMGGRLLLRLEELERRLEELERRLEELERFVAAWTL RVRALERRLEELERRIEEIARGSGDPNANPNVDPNANPNVNANPNANPNANP (SEQ ID №:5)

Такие конструкции состоят из следующих подструктур:

X	MGHHHHHHASWRWDGGLVPRGS (SEQ ID №:6)
ND1	WQTWNARWDQWSNDWNAWRSDWQAWRDDWARWRALWM (SEQ ID $\ensuremath{\mathbb{N}\!\!\!\!\!\!\!\!\!\!\!\!\!\!\!\!\!\!\!\!\!\!\!\!\!\!\!\!\!\!\!\!\!\!\!$
L1	GG
ND2	RLLLRLEELERRLEELERRLEELERFVAAWTLRVRALERRLEELERRIEEI ARG (SEQ ID №:8)
FLA	MAQVINTNSLSLLTQNNLNKSQSALGTAIERLSSGLRINSAKDDAAGQAI ANRFTANIKGLTQASRNANDGISIAQTTEGALNEINNNLQRVRELAVQSA NSTNSQSDLDSIQAEITQRLNEIDRVSGQTQFNGVKVLAQDNTLTIQVGA NDGETIDIDLKQINSQTLGLDSLNVHGAPVDPASPWTENPLQKIDAALAQ VDALRSDLGAVQNRFNSAITNLGNTVNNLSEARSRIEDSDYATEVSNMS RAQILQQAGTSVLAQANQVPQNVLSLLR (SEQ ID №:9)
Y	MGHHHHHHASEYLNKIQNSLSTEWSPSSVTGS (SEQ ID №:10)
ND3	WQTWNARWDQWSNDWNAWRSDWQAWRDDWARWRALWM (SEQ ID $\ensuremath{\mathbb{N}\!\!\!\!\!\!\!\!\!\!\!\!\!\!\!\!\!\!\!\!\!\!\!\!\!\!\!\!\!\!\!\!\!\!\!$
L2	GG
ND4	RLLLRLEELERRLEELERRLEELERFVAAWTLRVRALERRLEELERRIEEI ARG (SEQ ID №:8)
Z	SGDPNANPNVDPNANPNVNANPNANPNANP (SEQ ID №11)

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

MGHHHHHHASWRWDGGLVPRGS (SEQ ID №:6)

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

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

Исходный триптофан-зипперный домен пентамеризации имеет последовательность SSNAKWDQWSSDWQTWNAKWDQWSNDWNAWRSDWQAWKDDWARWNQR

WDNWAT

(SEQ ID №:12).

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

13-WQTWNARWDQWSNDWNAWRSDWQAWRDDWARWRALWM-49 (SEQ ID

№:7)

Далее данную последовательность удлиняют посредством короткого линкера L1 (GG) из двух остатков глицина, далее соединяют с доменом тримеризации ND2 следующей последовательности, которая представляет собой чрезвычайно устойчивый суперспиральный тример:

RLLLRLEELERRLEELERRLEELERFVAAWTLRVRALERRLEELERRIEEIARG

(SEQ ID №:8)

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

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

MAQVINTNSLSLLTQNNLNKSQSALGTAIERLSSGLRINSAKDDAAGQAIANRFT
ANIKGLTQASRNANDGISIAQTTEGALNEINNNLQRVRELAVQSANSTNSQSDLD
SIQAEITQRLNEIDRVSGQTQFNGVKVLAQDNTLTIQVGANDGETIDIDLKQINSQ
TLGLDSLNVHGAPVDPASPWTENPLQKIDAALAQVDALRSDLGAVQNRFNSAIT
NLGNTVNNLSEARSRIEDSDYATEVSNMSRAQILQQAGTSVLAQANQVPQNVLS
LLR (SEQ ID Nº:9)

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

MGHHHHHASWRWDGĞLVPRGSWQTWNARWDQWSNDWNAWRSDWQAWR
DDWARWRALWMGGRLLLRLEELERRLEELERRLEELERFVAAWTLRVRALERR
LEELERRIEEIARGMAQVINTNSLSLLTQNNLNKSQSALGTAIERLSSGLRINSAKD
DAAGQAIANRFTANIKGLTQASRNANDGISIAQTTEGALNEINNNLQRVRELAVQ
SANSTNSQSDLDSIQAEITQRLNEIDRVSGQTQFNGVKVLAQDNTLTIQVGANDG
ETIDIDLKQINSQTLGLDSLNVHGAPVDPASPWTENPLQKIDAALAQVDALRSDL
GAVQNRFNSAITNLGNTVNNLSEARSRIEDSDYATEVSNMSRAQILQQAGTSVLA
QANQVPQNVLSLLR (SEQ ID №:4)

Модель мономера FLA-SAPN-1a представлена на фиг. 1C. Соответствующая конструкция "FLA-SAPN-2" представляет собой следующее:

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

MGHHHHHHASEYLNKIONSLSTEWSPSSVTGS (SEQ ID №:10)

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

EYLNKIQNSLSTEWSPSSVT (SEQ ID №:13)

с одним цистеином, замененным на серии, и сайты рестрикции на уровне ДНК для дальнейшего субклонирования (NcoI, NdeI, BamH1) и, следовательно, несколько отличается от "X" в FL-SPAN-1а.

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

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

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

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

RLLLRLEELERRLEELERRLEELERFVAAWTLRVRALERRLEELERRIEEIARG

(SEQ ID №:8)

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

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

SGDPNANPNVDPNANPNVNANPNANPNANP (SEQ ID №:11)

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

MGHHHHHHASEYLNKIQNSLSTEWSPSSVTGSWQTWNARWDQWSNDWNAWR

(SEQ ID №:5)

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

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

EM-изображение совместно собранных белков FLA-SAPN-1a и FLA-SAPN-2 в соотношении 48:12

представлено на фиг. 4.

Примеры

Пример 1. Клонирование

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

MGHHHHHASWRWDGGLVPRGSWQTWNARWDQWSNDWNAWRSDWQAWR
DDWARWRALWMGGRLLLRLEELERRLEELERRLEELERFVAAWTLRVRALERR
LEELERRIEEI<u>ARG</u>SGSSARLSDLEANNAVKGESKITVNGAEYTANATGDKITLAG
KTMFIDKTASGVSTLINEDAAAAKKSTANPLASIDSALSKVDAVRSSLGAIQNRF
DSAIGSRNANDGISIAQTTEGALNEINNNLQRVRELSVQATNGTNSDSDLKSIQDE
IQQRLEEIDRVSNQTQFNGVKVLSQDNQMKIQVGANDGETITIDLQKIDVKSLGL
DGFNVNGPKEATVGDLKSSFKNVTGYDTYAAGADKYRVDINSGAV (SEQ ID
№:15)

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

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

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

Пример 2. Экспрессия

Плазмиды трансформировали в клетки кишечной палочки BL21 (DE3), которые выращивали в бульоне Луриа с ампициллином при 37° С. Экспрессию индуцировали изопропил- β -D-тиогалактопиранозидом. Через четыре часа после индукции, клетки убирали с 37° С и проводили их сбор при помощи центрифугирования при $4000 \times g$ в течение 15 мин. Клеточный осадок хранили при -20° С. Осадок оттаивали на льду и суспендировали в буфере для лизиса, состоящего из 9 М мочевины, 100 мМ NaH_2PO_4 , 10 мМ Tрис pH 8, 20 мМ имидазола и 0.2 мМ Tрис-2-карбоксиэтилфосфина (TCEP).

В качестве альтернативы другие клеточные линии также можно применять для экспрессии, такие как клетки KRX. В клетках KRX экспрессию можно осуществлять с протоколом ранней аутоиндукции клеток KRX с применением предварительной ночной культуры при 37° с ампициллином (100 мкг/мл) и глюкозой (0,4%). Проводили разбавление предварительных ночных культур в соотношении 1:100 в культуре для экспрессии, содержащей ампициллин (100 мкг/мл), глюкозу (0,05%) и рамнозу (0,1%) при 25°С в течение 24 ч. Уровень экспрессии белка оценивали при помощи электрофореза с додецилсульфатом натрия в полиакриламидном геле (ДСН-ПААГ-электрофореза), как представлено на фиг. 5. Конструкция образует мономеры, тримеры и тетрамеры даже в условиях денатурации при ДСН-ПААГ-электрофорезе.

Пример 3. Очистка

Лизис клеток проводили посредством разрушения их ультразвуком и лизат очищали при помощи центрифугирования при $30500 \times g$ в течение 45 мин. Очищенный лизат инкубировали с Ni-NTA агарозными гранулами (Qiagen, Valencia, CA, USA) в течение по меньшей мере 1 ч. Колонку промывали лизирующим буфером, а затем буфером, содержащим 9 М мочевины, 500 мМ NaH_2PO_4 , 10 мМ Tpuc pH 8, 20 мМ имидазола и 0.2 мМ TCEP. Белок элюировали с градиентом pH: 9 М мочевины, 100 мМ NaH_2PO_4 , 20 мМ цитрата, 20 мМ имидазола и 0.2 мМ TCEP. Последующие промывки проводили при pH 6.3, 5.9 и 4.5. Последующий градиента pH, градиент лизирующего буфера, увеличивающего эффективность действия имидазола, применяли для дальнейшего элюирования белка. Чистоту оценивали при помощи электрофореза с додецилсульфатом натрия в полиакриламидном геле (ДСН-ПААГ-электрофореза) как представлено на фиг. 5.

Пример 4. Рефолдинг

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

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

_	7111 / 1					\ 1 I	
	№	pН	NaCl (MM)	MES (MM)	HEPES (MM)	TRIS (MM)	Глицерин (%)
	1	6,5	50	20	_	-	5
	2	6,5	150	20	_	-	5
	3	7,5	50	-	20	-	5
	4	7,5	150	-	20	-	5
	5	8,5	50	_	_	20	5
	6	8,5	150	-	-	20	5

MES = 2-морфолиноэтансульфоновая кислота

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

TRIS = 2-амино-2-гидроксиметилпропан-1,3-диол

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

Пример 5-1. Исследование пути активации TLR5

Агонистическую активность LONG-D2-D1-огі на Toll-подобном рецепторе 5 (TLR5) исследовали, применяя клетки TLR5/SEAPorter HEK 293 (IMGENEX, Cat. No. EVIL-105) и оценивали EC_{50} активного LONG-D2-D1-огі. Клеточную линию EVIL-105 высевали в 96-луночные планшеты в количестве 5×10^4 клеток на лунку в течение 16 ч. Клетки обрабатывали различными концентрациями (от 0,01 до 1000 нг/мл) каждого испытуемого образца, положительным контролем (флагеллин EVIGENEX, Cat. No. EVIG-2205) или контрольным растворителем (каждым соответствующим буфером) в двух параллелях в течение 24 ч. Далее среду для культивирования клеток из каждой лунки разводили в соотношении 1:2 и переносили в 96-луночные микротитрационные планшеты в двух параллелях, в которые также в двух параллелях добавляли серийно разведенные стандарты секретируемой щелочной фосфатазы (SEAP). Чашки инкубировали при 65°C в течение 30 мин для инактивации любой эндогенной щелочной фосфатазы. Далее субстрат фосфатазы добавляли в каждую лунку и инкубировали при комнатной температуре в течение 30 мин. Планшеты анализировали посредством считывания при 405 нм и оценки чувствительной к дозе активности и оценки подготовленной EC_{50} (фиг. 7A).

Агонистическая активность TLR5 была умеренно высокой с расчетным значением EC_{50} 12,59 нг/мл в сравнении с 0,29 нг/мл положительного контроля флагеллина из Salmonella typhimurium.

Пример 6-II. Исследование пути активации TLR5

Соединение согласно формуле (Ia), обозначаемое T81c-WRW-8RRVRA-D0-D1 (FLJB SALTY):

MGHHHHHASWRWDGGLVPRGSWQTWNARWDQWSNDWNAWRSDWQAWR
DDWARWRALWMGGRLLLRLEELERRLEELERRLEELERFVAAWTLRVRALERR
LEELERRIEEIARGMAQVINTNSLSLLTQNNLNKSQSALGTAIERLSSGLRINSAKD
DAAGQAIANRFTANIKGLTQASRNANDGISIAQTTEGALNEINNNLQRVRELAVQ
SANSTNSQSDLDSIQAEITQRLNEIDRVSGQTQFNGVKVLAQDNTLTIQVGANDG
ETIDIDLKQINSQTLGLDSLNVHGAPVDPASPWTENPLQKIDAALAQVDALRSDL
GAVQNRFNSAITNLGNTVNNLSEARSRIEDSDYATEVSNMSRAQILQQAGTSVLA
OANOVPONVLSLLR (SEO ID №:4)

Соединение согласно формуле (II), обозначаемое T81c-WRW-8RRVRA-T1BT* (FLA-SAPN-2): MGHHHHHHASEYLNKIQNSLSTEWSPSSVTGSWQTWNARWDQWSNDWNAWR SDWQAWRDDWARWRALWMGGRLLLRLEELERRLEELERRLEELERFVAAWTL RVRALERRLEELERRIEEIARGSGDPNANPNVDPNANPNVNANPNANPNANP (SEQ ID №:5)

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

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

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

Пример 7-III. Исследование пути активации TLR5

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

Заместители Y и Z в PD52-2i88-PANDORA-Noro (формула II) представляют собой гистидиновую метку и последовательность длиной в 298 остатков из P-белка норовируса, связанную с ND4 посредством линкера GSGS соответственно. Данная последовательность соответствует P2-субдомену норовируса Hu/1968/US (Jiang X. и др., Virology 1993; 195(1):51-61) с соответствующим кодом pdb-ввода 1IHM для рентгеновской кристаллической структуры. Она содержит остатки 223 до 520, которые представляют собой домен P (у которого отсутствует 10 С-концевых остатков 521-530, так как 10 данных остатков разупорядочены в рентгеновской кристаллической структуре и являются в значительной степени положительно заряженными) плюс 3 аминокислоты С-концевой области домена S согласно номенклатуре, представленной Prasad B.V. V. и др., Science 1999; 286:287-290. Остаток треонина 223 тщательно выбирали при помощи программ компьютерной визуализации для того, чтобы он служил точкой присоединения к пого-SAPN, потому как она представляет собой наиболее близкую точку соприкосновения между участками поперек оси второго порядка в кристаллической структуре вирусного капсида.

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

Оценку чувствительной к дозе активности как агониста TLR5 и оценку EC_{50} проводили согласно протоколу, описанному в примере 5. Активность агониста TLR5 была умеренно высокой с рассчитанным значением EC_{50} всего лишь 17,66 нг/мл в сравнении с 0,29 нг/мл положительного контроля флагеллина из Salmonella Typhimurium (фиг. 7C).

Пример 8. Иммуногенность I

Две данные совместно собранные цепи являются подобными тем, которые описаны в примере 6. Там отсутствует Т-клеточный эпитоп Т1ВТ* в Y, и В-клеточный эпитоп из области повторения СS белка из Plasmodium falciparum в Z имеет длину всего лишь в 16 остатков. Тримерная суперспираль (ND2 и ND4) содержит рапDR-связывающий эпитоп PADRE. В цепи 1 (формула Ia) участок FLA состоит из доменов флагеллина D0 (остатки от 6 до 171) и D1 (остатки от 229 до 312), однако из фазы I варианта С150 среднего домена флагеллина Salmonella enterica подвида enterica serovar Турһітшгішт, который опятьтаки представляет собой иной штамм, нежели чем в примерах 1 и 6. D0 и D1 соединяют при помощи двух остатков глицина.

Клонирование, экспрессия, очистка и рефолдинг двух цепей по существу соответствуют протоколам, описанным в примерах 1, 2, 3 и 4. Условиями для рефолдинга данного типа совместно собранных наночастиц являются pH 8,5, 50 мМ NaCl, 20 мМ Трис, 5% глицерина. ЕМ-изображение совместно собранных наночастиц в соотношении 3:57 представлено на фиг. 4В.

Иммунизацию групп из семи мышей C57B1/6 осуществляли внутрибрюшинно либо 10 мкг, либо 1 мкг тремя инъекциями каждые две недели. Иммуногены представляли собой либо только T81c-8-Pf (формула II), либо совместную сборку T81c-8-D0-D1 (формула Ia) и T81c-8-Pf (формула II) в двух различных соотношениях совместной сборки 3:57 и 9:51. Другими словами - предполагая Т1-икосаэдрическую симметрию наночастиц - присутствовали три различных иммуногена, которые содержали либо ноль, либо три, либо девять молекул D0-D1 на наночастицу. Титр антител после третьей инъекции определяли при помощи ИФА, что представлено на фиг. 8А. Предполагали предельное значение параметра иммунной реакции с 1 мкг при соотношении совместной сборки в 3:57 (что соответствует в общей сложности примерно 20 нг флагеллина), повышающее титр антител примерно в девять раз по сравнению с наночастицами без доменов D0-D1. Доза выше 10 мкг при соотношении совместной сборки в 9:51 (что соответствует в общей сложности приблизительно 2 мкг флагеллина) фактически несколько снижает иммунную реакцию по сравнению с наночастицами без доменов D0-D1.

Пример 9. Иммуногенность II

(SEQ ID №:21)

Соединение согласно формуле (II), обозначаемое DIM-D2-D1-tip3 NIC-pept:

МGHHHHHHASGSWEEWNARWDEWENDWNDWREDWQAWRDDWARWRATW

MGGRLLSRLERLERRNEELRRLLQLLRNRLERLAOFVRALSMQNAELERRLEEL

ARGSGSSARLSDLEANNAVRGESKITVNGAEYTANATGDRITLAGRTMFIDRTAS GVSTLINEDAAAARRSTANPLASIDSALSRVDAVRSSLGAIQNRFDSAKAKKKDG KDDKDSKNANDGISIAQTTEGALNEINNNLQRVRELSVQATNGTNSDSDLRSIQD EIQQRLEEIDRVSNQTQFNGVKVLSQDNQMKIQVGAKDGETITIDLQKIDVKSLG LDGFNVNGPREATVGDLRSSFRNVTGYDTYAAGADRYRVDINSGAV (SEQ ID №:22)

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

MAQVINTNSLSLLTQNNLNKSQSALGTAIERLSSGLRINSAKDDAAGQAIANRFT
ANIKGLTQASRNANDGISIAQTTEGALNEINNNLQRVRELAVQSANSTNSQSDLD
SIQAEITQRLNEIDRVSGQTQFNGVKVLAQDNTLTIQVGANDGETIDIDLKQINSQ
TLGLDSLNVHGAPVDPASPWTENPLQKIDAALAQVDALRSDLGAVQNRFNSAIT
NLGNTVNNLSEARSRIEDSDYATEVSNMSRAQILQQAGTSVLAQANQVPQNVLS
LLR (SEQ ID №:23)

соответствует "FLA" в формуле (Ia), в то время как последовательность D2-D1-tip3 SARLSDLEANNAVRGESKITVNGAEYTANATGDRITLAGRTMFIDRTASGVSTLI NEDAAAARRSTANPLASIDSALSRVDAVRSSLGAIQNRFDSAKAKKKDGKDDKD SKNANDGISIAQTTEGALNEINNNLQRVRELSVQATNGTNSDSDLRSIQDEIQQRL EEIDRVSNQTQFNGVKVLSQDNQMKIQVGAKDGETITIDLQKIDVKSLGLDGFNV NGPREATVGDLRSSFRNVTGYDTYAAGADRYRVDINSGAV (SEQ ID №:24)

соответствует "Z" в формуле (II). Данная последовательность "Z" в D2-D1-tip3 представляет собой модификацию флагеллина, в котором домен D2 скомбинирован с доменом D1 флагеллина как это описано выше. Кроме того, белковую подложку D2-D1-Tip3 применяют в качестве носителя для отображения антигена никотина. Для того, чтобы допустить ковалентное связывание активированного никотина с белковой подложкой, боковые цепи лизина, которые не экспонированы на поверхность, подвергают мутированию до аргининов, в то время как аргинины, которые экспонированы на поверхность, подвергают мутированию до лизинов. После ковалентного присоединения активированного никотина к первичным аминам белковой последовательности, далее никотин располагается на поверхности наночастицы. Более того, для того, чтобы расположить молекулы никотина на внешней поверхности наночастиц, белок D2-D1 осуществляет перенос так называемой последовательности "tip3" КАКККDGKDDKD (SEQ ID №: 25) на наиболее экспонированный участок молекулы (рис 2A), которая содержит высокую плотность лизинов, следовательно, ковалентное связывание никотина с боковыми цепями лизина будет обеспечивать то, что молекулы никотина с высокой плотностью располагаются на поверхности наночастицы.

Кор DIM-D0-D1 и DIM-D2-D1-tip3_NIC-pept (т.е. ND1-L1-ND2 и ND3-L2-ND4) является идентичным, и, в частности, домены олигомеризации ND2 и ND4 соответственно сконструированы для образования димерных суперспиралей. Это позволяет располагать молекулу флагеллина (в любой форме) в качестве димера, готового взаимодействовать с димерным TL5-рецептором (фиг. 2B).

Клонирование, экспрессия, очистка и рефолдинг двух цепей по существу соответсвует протоколам, описанным в примерах 1, 2, 3 и 4. Условиями для рефолдинга для данного типа совместно собранных наночастиц являются рН 7,0, 50 мМ NaCl, 20 мМ HEPES, 5% глицерина. ЕМ-изображение совместно собранных наночастиц в соотношении 5:55 представлено на фиг. 4D.

Иммунизацию групп из семи мышей C57BI/6 осуществляли внутрибрюшинно 10 мкг в трех инъекциях каждые две недели. Иммуногены представляли собой либо совместную сборку DIM-D0-D1 (формула Ia) и DIM-D2-D1-tip3_NIC-рерt (формула II) в соотношении совместной сборки 5:55, либо стандартный носитель гемоцианин фиссуреллы (КLH), к которому прикрепляли аналогичную активированную молекулу никотина. КLH представляет собой большой, мультисубъединичный, переносящий кислород металлопротеин, обнаруживаемый в гемолимфе Megathura crenulatan часто применяемый в качестве носителя для антигенов в экспериментах по иммунизации. Титр антител после третьей инъекции определяли при помощи ИФА, что представлено на фиг. 8В. Титр антител наночастиц иммуногена данного типа с TLR5-агонистом значительно увеличен по сравнению с титром стандартного носителя КLH, располагающего тот же самый антиген (никотин) на своей поверхности.

Пример 10. Иммуногенность III

Соединение согласно формуле (Ia), обозначаемое DEDDL:

MGDKHHHHHHKDGSDKGSWEEWNARWDEWENDWNDWREDWQAWRDDWA RWRATWMGGRLLSRLERLERRNEELRRLLQLLRNRLERLAQFVRALSMQNAEL ERRLEELARGMAQVINTNSLSLLTQNNLNRSQSALGTAIERLSSGLRINSARDDA AGQAIANRFTANIRGLTQASRNANDGISIAQTTEGALNEINNNLQRVRELAVQSA NSTNSQSDLDSIQAEITQRLNEIDRVSGQTQFNGVRVLAQDNTLTIQVGANDGETI DIDLRQINSQTLGLDQLNVQQKYKDGDKGDDKTENPLQRIDAALAQVDALRSDL GAVQNRFNSAITNLGNTVNNLSEARSRIEDSDYATEVSNMSRAQILQQAGTSVLA QANQVPQNVLSLLR (SEQ ID №26)

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

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

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

Предварительно до замены буфера для реакции связывания, объединенные фракции элюции из аффинной очистки инкубировали с 5 мМ ЭДТА по меньшей мере в течение часа для связывания в хелатный комплекс любых возможных выщелоченных ионов никеля. Далее буфер заменяли, применяя обессоливающую колонку HiPrep 26/10. Колонку уравновешивали следующим связывающим буфером: 6 М гуанидингидрохлорида, 150 мМ NaCl, 20 мМ HEPES pH 7,2 в объеме пяти колонок с последующим связыванием образца в колонке. Стадию элюирования проводили связующим буфером в объеме двух колонок.

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

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

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

Иммунизацию групп из трех 6 мышей C57BI/6 осуществляли подкожно либо 10 мкг Nic-DEDDL, либо 10 мкг Nic-KLH (никотин, соединенный с гемоцианином фиссуреллы) в качестве положительного контроля в трех инъекций каждая с недельным перерывом. Титр антител в нулевой день (т.е. до первой инъекции) и далее неделю спустя после каждой инъекции (день 7, 14 и 21) определяли при помощи ИФА, что представлено на фиг. 10. Данные эксперименты показывают высокую иммуногенность Nic-DEDDL с более чем 30-кратно лучшей индукцией антител по сравнению с Nic-KLH. Пиковые значения только после 3 вакцинаций находятся в титрах, близких к 163840.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Белковая наночастица для иммуномодуляции, обладающая способностью самосборки, которая состоит из агрегатов множества строительных блоков, образующих непрерывную цепь, которые имеют формулу (Ia), (Ib), (Ic) или (Id):

X-ND1-L1-ND2-FLA (Ia), FLA-ND1-L1-ND2-X (Ib), X-ND1-ND2-FLA (Ic), FLA-ND1-ND2-X (Id),

где ND1 представляет собой суперспирализованный домен олигомеризации, который образует олигомеры $(ND1)_m$,

ND2 представляет собой суперспирализованный домен олигомеризации, который образует олиго-

меры (ND2)_n,

причем m и n представляют собой натуральные числа от 2 до 10 при условии, что m не равно n и не кратно n и n не кратно m,

L1 представляет собой короткий гибкий линкер,

FLA представляет собой флагеллин или его производное, в котором по меньшей мере один из доменов D2 и D3 флагеллина делетирован и/или заменен на сегмент, представляющий собой гибкий линкер из 1-20 аминокислот, который соединяет два конца оставшейся последовательности флагеллина;

X отсутствует или представляет собой последовательность, содержащую от 2 до 1000 аминокислот, при этом X представляет собой антигенную последовательность.

2. Белковая наночастица по п.1, дополнительно включающая множество строительных блоков, образующих непрерывную цепь, которые имеют формулу (IIa) или (IIb):

Y-ND3-L2-ND4-Z (IIa), Y-ND3-ND4-Z (IIa),

где ND3 представляет собой суперспирализованный домен олигомеризации, который образует олигомеры (ND3)_у,

ND4 представляет собой суперспирализованный домен олигомеризации, который образует олигомеры (ND4)_z,

причем у и z представляют собой натуральные числа от 2 до 10 при условии, что у не равно z и не кратно z и z не кратно y, и

при этом ND3 идентичен ND1 и/или ND4 идентичен ND2,

L2 представляет собой короткий гибкий линкер, отличный от L1 или идентичный L1, и

Y и Z независимо друг от друга отсутствуют или представляют собой последовательность, содержащую от 2 до 1000 аминокислот, при этом Y и Z представляют собой антигенную последовательность.

- 3. Белковая наночастица по любому из пп.1, 2, отличающаяся тем, что FLA представляет собой производное флагеллина, у которого делетированы домены флагеллина D2 и D3.
- 4. Белковая наночастица по любому из пп.1-3, отличающаяся тем, что FLA представляет собой производное флагеллина, которое содержит эпитоп В-клетки и/или эпитоп Т-клетки.
- 5. Белковая наночастица по любому из пп.1-4, отличающаяся тем, что n в строительном блоке формулы (Ia) или m в строительном блоке формулы (Ib) равно 2.
- 6. Белковая наночастица по п.5, отличающаяся тем, что FLA через домен D2 флагеллина связан с доменом олигомеризации $(ND2)_2$ формулы (Ia) или с доменом олигомеризации $(ND1)_2$ в формуле (Ib).
- 7. Белковая наночастица по любому из пп.1-6, отличающаяся тем, что по меньшей мере один из ND1, ND2, ND3 и ND4 представляет собой домен тримеризации белка фибритина бактериофага Т4.
- 8. Композиция для иммуномодуляции, содержащая эффективное количество белковой наночастицы по любому из пп.1-7.
- 9. Мономерный строительный блок, образующий непрерывную цепь, формулы (Ia), (Ib), (Ic) или (Id):

X-ND1-L1-ND2-FLA (Ia), FLA-ND1-L1-ND2-X (Ib), X-ND1-ND2-FLA (Ic), FLA-ND1-ND2-X (Id)

для сборки белковой наночастицы по п.1,

где ND1 представляет собой суперспирализованный домен олигомеризации, который образует олигомеры $(ND1)_m$,

ND2 представляет собой суперспирализованный домен олигомеризации, который образует олигомеры (ND2)_n,

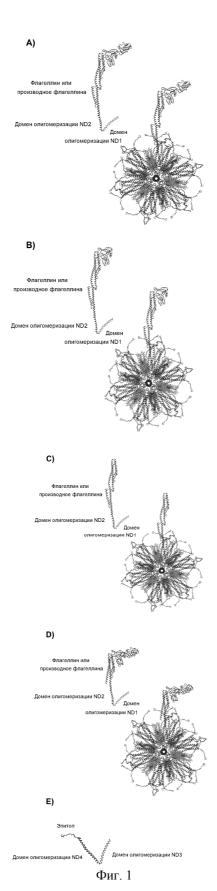
причем m и n представляют собой натуральные числа от 2 до 10, при условии, что m не равно n и не кратно n и n не кратно m,

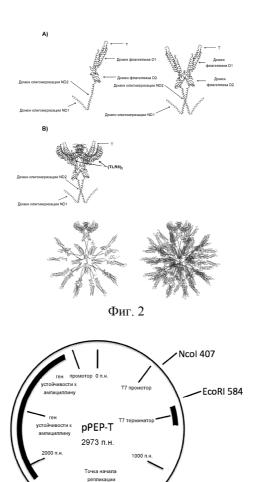
L1 представляет собой короткий гибкий линкер,

FLA представляет собой флагеллин или его производное, в котором по меньшей мере один из доменов D2 и D3 флагеллина делетирован и/или заменен на сегмент, представляющий собой гибкий линкер из 1-20 аминокислот, который соединяет два конца оставшейся последовательности флагеллина;

X отсутствует или представляет собой последовательность, содержащую от 2 до 1000 аминокислот, при этом X представляет собой антигенную последовательность.

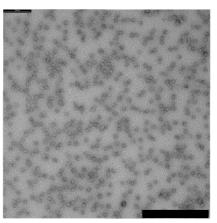
10. Способ вакцинации человека, включающий введение эффективного количества белковой наночастицы по любому из пп.1-7.



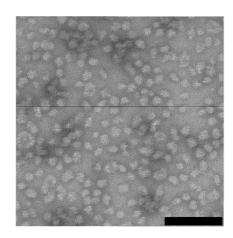


Фиг. 3

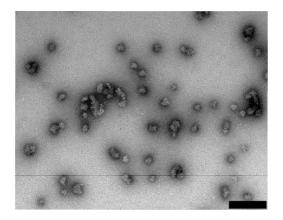
Α



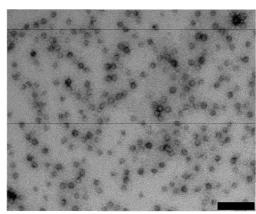
В



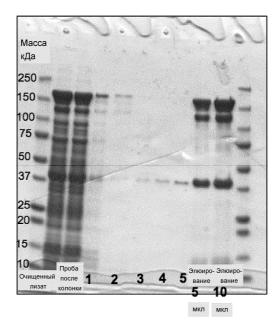
С



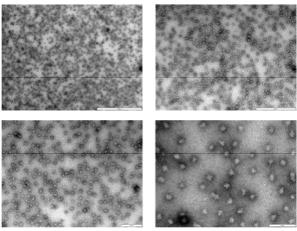
D



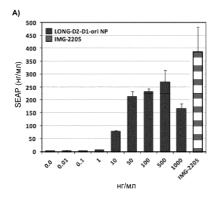
Фиг. 4

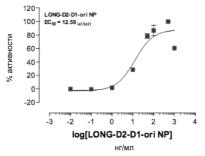


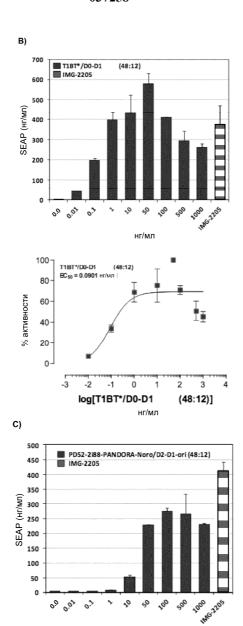
Фиг. 5

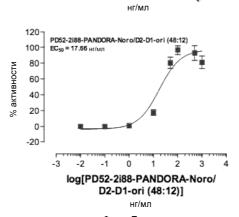


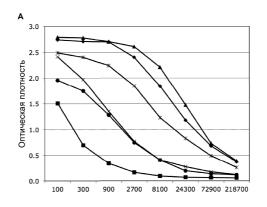
Фиг. 6

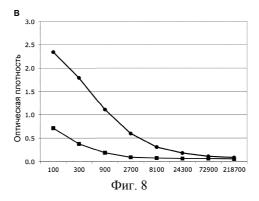


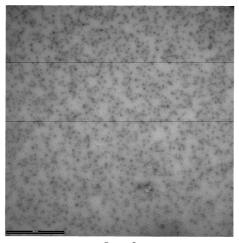












Фиг. 9

