

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202092204 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2021.02.09

(22) Дата подачи заявки
2019.03.19

(51) Int. Cl. A61K 35/744 (2015.01)
A61K 38/16 (2006.01)
C07K 14/315 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 37/04 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)

(54) КОМПОЗИЦИИ

(31) 1804384.4; 1809953.1; 18178350.7; 1811900.8;
1812378.6; 1813423.9; 1813444.5; 1816834.4;
1817641.2; 1901199.8; 1901218.6; 1901993.4;
1901992.6

(32) 2018.03.19; 2018.06.18; 2018.06.18; 2018.07.20;
2018.07.30; 2018.08.17; 2018.08.17; 2018.10.16;
2018.10.29; 2019.01.29; 2019.01.29; 2019.02.13;
2019.02.13

(33) GB; GB; EP; GB; GB; GB; GB; GB;
GB; GB; GB; GB; GB

(86) PCT/EP2019/056809

(87) WO 2019/180000 2019.09.26

(71) Заявитель:
4Д ФАРМА РИСЕРЧ ЛИМИТЕД (GB)

(72) Изобретатель:
Малдер Имке Элизабет, Рафтис Эмма,
Хеннеси Эмма Элизабет Клер, Лот-
Кали Дельфин Луиз Клодетт, Коун
Филип (GB)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(57) Изобретение относится к композициям, содержащим полипептиды флагеллина из штаммов бактерий, и к применению таких композиций при лечении заболеваний.

A1

202092204

202092204

A1

КОМПОЗИЦИИ**ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ**

Данное изобретение относится к области композиций, содержащих полипептиды флагеллина из бактериальных штаммов, и применению таких композиций при лечении заболеваний.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Считается, что кишечник человека стерилен *in utero*, но непосредственно после рождения он подвергается воздействию целого ряда материнских микробов и микробов из окружающей среды. После этого наступает динамический период микробной колонизации и сукцессии, на который влияют такие факторы, как способ родоразрешения, окружающая среда, рацион и генотип хозяина, все из которых оказывают влияние на композицию кишечной микробиоты, в частности, во время раннего периода жизни. Впоследствии микробиота стабилизируется и становится такой как у взрослых []. Кишечная микробиота человека содержит более 500-1000 разных филотипов, принадлежащих преимущественно двум основным группам бактерий - Bacteroidetes и Firmicutes []. Успешное симбиотическое взаимодействие в результате бактериальной колонизации человеческого кишечника привело к появлению широкого ряда метаболических, структурных, защитных и других благоприятных функций. Повышенная метаболическая активность колонизированного кишечника гарантирует, что неперевариваемые в ином случае компоненты пищи расщепляются с высвобождением побочных продуктов, обеспечивая важный источник питательных веществ для хозяина. Аналогично, хорошо известно иммунологическое значение кишечной микробиоты, которое можно проиллюстрировать на примере безмикробных животных, имеющих нарушенную иммунную систему, которая функционально восстанавливается после внесения комменсальных бактерий [-].

В отличие от продукции секреторного кишечного IgA, на которую влияет микробная колонизация как таковая [-], развитие и дифференцировка Т-клеток, по-видимому, требует колонизации специфическими комменсальными микроорганизмами. Виды Clostridium, и в частности спорообразующие сегментированные нитчатые бактерии (SFB - segmented filamentous bacteria), по-видимому, являются мощным стимулом для дифференциации и созревания Th1, Th17 и Treg кишечника и толстого кишечника [-]. Более поздние исследования показали, что другие кишечные бактерии, включая бактерии Clostridium кластеров IV и XIVa и измененную флору Шедлера (ASF - Altered Schaedler Flora), могут индуцировать образование Treg de novo, в то время как моноколонизация с Bacteroides fragilis может корректировать дисбаланс Th1/Th2 у безмикробных мышей, способствуя увеличению Treg [5][-]. Эти данные указывают на важные иммунорегулирующие эффекты других резидентных кишечных бактерий. Очевидно, что влияние комменсальных бактерий на пути дифференцировки Т-клеток варьирует и, как предполагалось ранее, может зависеть от набора обнаруженных лигандов TLR, связанных с конкретными бактериями [].

Например, механизм, с помощью которого SFB влияют на Т-клеточные ответы, в данное время неизвестен, но недавние исследования генома, подтверждающие присутствие генов флагеллина, предполагают, что врожденные ответы, опосредованные взаимодействиями TLR5-флагеллин, могут играть определенную роль [-].

Флагеллин - один из основных компонентов бактериального жгутика. Жгутик - это ресничный отросток, который обеспечивает подвижность бактерии и может действовать как сенсорная органелла. Структура и состав бактериального флагеллина были всесторонне изучены на модельных организмах, таких как *Salmonella typhimurium* и *E. coli*. Флагеллин *Salmonella typhimurium* и *E. coli* активирует иммунную систему через рецептор TLR5, что приводит к активации множества провоспалительных генов и генов иммунного ответа []. Было высказано предположение, что агонисты TLR5, такие как флагеллин *Salmonella typhimurium*, могут действовать как противораковые агенты []. *Salmonella typhimurium*, сконструированная для экспрессии флагеллина *Vibrio vulnificus*, также была предложена в качестве противоракового агента []. Кроме того, было высказано предположение, что пептиды флагеллина из *Salmonella typhimurium*, *Vibrio cholera* и *Shigella dysenteriae* могут быть использованы для производства вакцин против инфекционных заболеваний, таких как брюшной тиф, холера и дизентерия, когда они экспрессируются генетически модифицированными кишечными бактериями []. Однако флагеллин из других видов бактерий остается плохо охарактеризованным, и подобный другой флагеллин может иметь другие эффекты или применения.

Были зарегистрированы сильные изменения в композиции микробиоты при желудочно-кишечных расстройствах, таких как воспалительное заболевание кишечника (ВЗК). Например, уровни бактерий *Clostridium* кластера XIVa снижены у пациентов с ВЗК (IBD), тогда как количество *E. coli* повышено, что позволяет предположить наличие сдвига в балансе симбионтов и патобионтов в кишечнике [-]. Интересно, что этот микробный дисбиоз также связан с дисбалансом в популяциях эффекторных Т-клеток.

Признавая потенциальный положительный эффект, который некоторые штаммы бактерий могут оказывать на кишечник животных, были предложены различные штаммы для применения при лечении различных заболеваний (см., например, [-]). Кроме того, определенные штаммы, включая в основном штаммы *Lactobacillus* и *Bifidobacterium*, были предложены для применения при лечении различных воспалительных и аутоиммунных заболеваний, которые напрямую не связаны с кишечником (см. [] и [] для обзора). Однако взаимосвязь между различными заболеваниями и различными штаммами бактерий, а также точное воздействие определенных штаммов бактерий на кишечник и на системном уровне, а также на любые определенные типы заболеваний плохо изучены. Например, определенные виды *Enterococcus* были причастны к возникновению рака [].

Было высказано предположение, что некоторые штаммы *Streptococcus* и *Veillonella* и, в меньшей степени, штаммы *Enterococcus* и *Lactobaccillus* обладают иммуномодулирующим действием, с различными эффектами на различные цитокины *in vitro*. Однако взаимосвязь между различными заболеваниями и различными штаммами

бактерий, а также точное воздействие определенных штаммов бактерий на кишечник и на системном уровне, а также на любые определенные типы заболеваний плохо изучены.

В данной области техники требуются новые способы лечения заболеваний. Также необходимо охарактеризовать потенциальные эффекты кишечных бактерий, чтобы можно было разработать новые способы лечения.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Изобретатели разработали новые терапии для лечения и профилактики заболеваний. В частности, изобретатели определили, что полипептиды флагеллина из рода *Enterococcus* полезны в терапии. Как показано в примерах, полипептиды флагеллина из рода *Enterococcus* могут сильно активировать ответы TLR5 на уровнях, значительно превышающих уровни хорошо известного агониста TLR5 флагеллина *Salmonella typhimurium*.

В предпочтительных вариантах осуществления данного изобретения, изобретение относится к полипептидам флагеллина из вида *Enterococcus gallinarum* для применения в терапии. В других предпочтительных вариантах осуществления данного изобретения, полипептид флагеллина получают из штамма, депонированного в NCIMB под номером доступа NCIMB 42488. В предпочтительных вариантах осуществления данного изобретения, полипептид флагеллина представляет собой SEQ ID NO: 1. Примеры демонстрируют, что полипептиды флагеллина из штамма MRx0518 (штамм, депонированный под номером доступа NCIMB 42488) могут более сильно активировать ответ TLR5 по сравнению с полипептидами флагеллина из других штаммов *Enterococcus gallinarum*. Таким образом, полипептиды флагеллина из штамма NCIMB 42488 особенно эффективны для применения в терапии.

В предпочтительных вариантах осуществления данного изобретения, полипептид флагеллина по изобретению находится в мономерной форме, которая позволяет полипептиду более эффективно связываться с рецептором TLR5.

Примеры демонстрируют, что полипептиды флагеллина из штамма NCIMB 42488 особенно эффективны при активации ответа TLR5. Полипептиды флагеллина из штамма NCIMB 42488 могут не содержать домен D3, и авторы изобретения отметили, что большая часть вариации последовательности между различными полипептидами флагеллина наблюдается в участке D2-D3. В предпочтительных вариантах осуществления данного изобретения, изобретение относится к полипептидам флагеллина из рода *Enterococcus* или вида *Enterococcus gallinarum*, которые не содержат домен D3.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, полипептид флагеллина по данному изобретению является частью сборки бактериальных жгутиков. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, данное изобретение относится к сборке бактериальных жгутиков, содержащих полипептид флагеллина по данному изобретению. В предпочтительных вариантах осуществления данного изобретения, сборка бактериальных жгутиков содержит белки FliL и FlaG. Белки FliL и FlaG присутствуют в сборке бактериальных жгутиков MRx0518. Примеры демонстрируют, что полипептид

флагеллина из MRx0518 особенно эффективны при активации ответа TLR5.

Изобретение также относится к полинуклеотидной последовательности, которая кодирует полипептид флагеллина из рода *Enterococcus*, для применения в терапии. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, полинуклеотидная последовательность кодирует полипептид флагеллина из вида *Enterococcus gallinarum* для применения в терапии. В предпочтительных вариантах осуществления данного изобретения, полинуклеотидная последовательность кодирует полипептид флагеллина из штамма MRx0518 для применения в терапии.

В других вариантах осуществления данного изобретения, изобретение относится к клетке-хозяину, экспрессирующей рекомбинантный полипептид флагеллина из рода *Enterococcus*, для применения в терапии. В других вариантах осуществления данного изобретения, изобретение также относится к клетке-хозяину, содержащей последовательность рекомбинантного полинуклеотида, которая кодирует полипептид флагеллина из рода *Enterococcus*, для применения в терапии.

Изобретение относится к композиции, содержащей полипептиды флагеллина по изобретению. Изобретение также относится к композициям, содержащим полинуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид флагеллина по изобретению. Изобретение также относится к клетке-хозяину, которая экспрессирует полипептид флагеллина по изобретению. Кроме того, изобретение также относится к композициям, содержащим клетку-хозяин, при этом клетка-хозяин содержит полинуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид флагеллина по изобретению.

Известно, что активация TLR5 флагеллином *S. typhimurium* подавляет пролиферацию клеток и рост опухоли [48]. Композиции, содержащие штаммы *Enterococcus gallinarum*, эффективны при лечении и профилактике рака [50]. Авторы изобретения неожиданно показали, что полипептиды флагеллина из вида *Enterococcus gallinarum* способны стимулировать сильный ответ TLR5, который может способствовать противораковой активности штаммов *Enterococcus*. Таким образом, изобретатели продемонстрировали, что полипептиды флагеллина из рода *Enterococcus* и, в частности, вида *Enterococcus gallinarum* полезны в терапии и особенно эффективны при лечении и профилактике рака.

В предпочтительных вариантах осуществления данного изобретения, композиции, содержащие полипептиды флагеллина из рода *Enterococcus*, предназначены для применения для лечения иммуногенных опухолей и/или солидных опухолей. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, композиции, содержащие полипептиды флагеллина из рода *Enterococcus*, предназначены для применения в способе лечения или профилактики рака легкого, рака груди, рака печени или рака толстой кишки. Композиции, содержащие полипептиды флагеллина из рода *Enterococcus*, могут быть особенно эффективными для уменьшения размера опухоли или предотвращения роста опухоли при лечении рака.

В предпочтительных вариантах осуществления данного изобретения, композицию по данному изобретению вводят путем инъекции, предпочтительно подкожно или, альтернативно, внутривенно или внутривенно.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, например, когда композиция содержит клетку-хозяина по данному изобретению, композиция по данному изобретению предназначена для перорального введения. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения композиция по данному изобретению содержит одно или более фармацевтически приемлемых эксципиентов или носителей.

Кроме того, изобретение относится к способу лечения заболевания, включающему введение композиции, содержащей полипептид флагеллина из бактериального штамма рода *Enterococcus*, пациенту, нуждающемуся в этом. В предпочтительных вариантах осуществления данного изобретения, изобретение относится к способу лечения или профилактики рака, включающий введение композиции, содержащей полипептид флагеллина из бактериального штамма рода *Enterococcus*, пациенту, нуждающемуся в этом.

Изобретатели разработали новые композиции, содержащие полипептид флагеллина из рода *Enterococcus*, предпочтительно из вида *Enterococcus gallinarum*, которые можно использовать для стимуляции иммунной системы и лечения и профилактики заболеваний. Изобретатели определили, что такие композиции могут сильно активировать иммунную систему и могут лечить рак, что указывает на то, что они могут также лечить другие заболевания, при которых активация иммунной системы может быть полезной.

Таким образом, изобретение относится к композиции, содержащую полипептид флагеллина из рода *Enterococcus*, для применения при стимуляции иммунной системы у субъекта.

В дополнительных аспектах изобретение относится к композиции, содержащей полипептид флагеллина из рода *Enterococcus*, для применения при лечении, предотвращении или замедлении старения иммунной системы.

В дополнительных аспектах изобретение относится к композиции, содержащей полипептид флагеллина из рода *Enterococcus*, для применения в качестве адъюванта вакцины.

В дополнительных аспектах изобретение относится к композиции, содержащей полипептид флагеллина из рода *Enterococcus*, для применения в усилении клеточной терапии, такой как CAR-T.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

Фиг. 1: Структура флагеллина и поперечный разрез и вид сверху филамента жгутика. Филамент жгутика состоит из одного белка - флагеллина. Участок узнавания TLR5 находится в домене D1 и недоступен, когда флагеллин полимеризуется в филаменте жгутика. Изображение взято из ссылки [1].

Фиг. 2: Выравнивание белковой последовательности 24 полипептидов флагеллина из вида *Enterococcus gallinarum* и модельного организма *S. typhimurium*. Выделены домены D0, D1 и D2 и предполагаемые сайты связывания TLR5 для полипептида флагеллина из

штамма MRx0518.

Фиг. 3: Выравнивание белковой последовательности полипептидов флагеллина из штамма MRx0518 с 23 полипептидами флагеллина из этого вида *E. gallinarum*. Выделены домены D0, D1 и D2 и предполагаемые сайты связывания TLR5 для полипептида флагеллина из штамма MRx0518.

Фиг. 4: Схема пути KEGG сборки жгутиков. Гены, выделенные серым цветом, присутствуют у вида.

Фиг. 5: Сравнение предсказанной структуры белка флагеллина MRx0518 (FliC_{MRx0518}) с известной структурой белка флагеллина *S. typhimurium*. Структура белка флагеллина *S. typhimurium* взята из ссылки [30].

Фиг. 6: Активация MRx0518 TLR5 репортерных клеток.

Фиг. 7: Штамм-специфическая активация TLR5 репортерных клеток.

Фиг. 8: ответ TLR5 CFS от MRx0518 и DSM100110 после обработки трипсином.

Фиг. 9: а) Стратегия клонирования для продукции рекомбинантных белков флагеллинов в *E. coli*; б) Оценка качества очищенных рекомбинантных белков флагеллинов, FlaA_{MRx0518} и FlaA_{DSM100110} на SDS-PAGE геле.

Фиг. 10: Сравнение активации TLR5 с FlaA_{MRx0518}, FlaA_{DSM100110} и CFS из MRx0518 и DSM100110.

Фиг. 11: Фенотипическая характеристика MRx0518 *flaA*⁻ мутанта.

Фиг. 12: Активация TLR5 с MRx0518 *flaA*⁻ мутанта CFS.

Фиг. 13: *flaA* стратегия мутации.

Фиг. 14: Электронная микроскопия MRx0518.

Фиг. 15: Активация мышинового TLR5 рекомбинантными белками флагеллинами из MRx0518 и DSM 100110. Данные представляют три независимых повтора.

Фиг. 16: Выравнивание последовательностей белков флагеллинов из MRx0518 и DSM 100110, проведенное с использованием программного обеспечения для множественного выравнивания последовательностей CLUSTAL OMEGA v2.1.

Фиг. 17: Активация человеческого TLR5 подвижными штаммами *E. gallinarum* и *E. casseliflavus*. Данные представляют собой среднее значение и стандартное отклонение для 3 биологических повторов. Значимость оценивалась односторонним тестом ANOVA - «а» обозначает $p < 0,0001$.

Фиг. 18: Активация NF-κB с помощью MRx0518.

Фиг. 19: Индукция дифференцировки Т-клеток в популяции (А) Т-хелперных клеток и (В) цитотоксических Т-лимфоцитов (CTL - Cytotoxic T Lymphocytes) с использованием супернатанта от MRx518 и среды RPMI в качестве контроля, без добавления цитокинов (без цито).

Фиг. 20: Альтернативная *flaA* стратегия мутации.

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Флагеллин

Флагеллин, основной компонент бактериальных жгутиков, стимулирует защиту

хозяина у множества организмов, включая млекопитающих, насекомых и растения. Структура и состав бактериального флагеллина были всесторонне изучены на модельных организмах, таких как *S. typhimurium* и *E. coli*. Однако имеются очень ограниченные данные, описывающие флагеллин из рода *Enterococcus* и, в частности, вида *Enterococcus gallinarum*.

Флагеллин может существовать либо в виде мономерного белка, либо может быть полимеризован с образованием флагеллина жгутика. Бактериальные филаменты жгутика *Salmonella* состоят примерно из 20000 единиц белка флагеллина. Филаменты жгутика образуют часть полностью собранного бактериального жгутика.

Белки флагеллины обычно содержат 3-4 домена (D0, D1, D2 и D3), причем домены D0 и D1 состоят из складок с N- и C-концов []. Во время сборки филамента жгутика домены D0 и D1 погребены внутри филамента жгутика с доменами D2 и/или D3, обращенными наружу (Фиг. 1).

Было показано, что аминокислотные мотивы в консервативном домене D1 необходимы для узнавания и взаимодействия TLR5 [-]. Также было показано, что домен D0 влияет на передачу сигналов TLR5 []. Сайт узнавания TLR5 обычно недоступен в филаменте жгутика. Флагеллин более эффективно взаимодействует с TLR5 в его мономерной форме, поскольку сайты связывания TLR5 недоступны при сборке в филаменте [30]. Центральный участок белка флагеллина демонстрирует вариабельность последовательности и не был широко изучен, но считается антигенным и иммуногенным участком белка.

Домены D0 и D1 высококонсервативны, а домены D2 и D3 более вариабельны []. Фиг. 2 представляет собой выравнивание последовательностей белков флагеллинов из рода *Enterococcus* с широко изученным белком жгутика из *S. typhimurium*. Большая часть вариации последовательности между белком флагеллина из *S. typhimurium* и белками флагеллинами из рода *Enterococcus* находится в центральном участке (домен D2-D3). Большая часть вариации последовательности между различными штаммами *Enterococcus gallinarum* также наблюдается в этом участке, например, между белками флагеллинами из штаммов MRx0518 и DSM100110 (Фиг. 3).

Филамент жгутика является составной частью бактериального жгутика. Гены, которые, как известно, участвуют в сборке бактериального жгутика, суммированы на Фиг. 4. Заштрихованные серым цветом присутствуют в *Enterococcus gallinarum*. Белки флагеллины кодируются FliC, который также взаимозаменяемо обозначается в данном документе как FlaA.

Изобретение относится к полипептиду флагеллина из рода *Enterococcus* для применения в терапии. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, изобретение относится к полипептиду флагеллина из вида *Enterococcus gallinarum* для применения в терапии. В предпочтительных вариантах осуществления данного изобретения, изобретение относится к полипептиду флагеллина из штамма MRx0518 для применения в терапии. Примеры демонстрируют, что полипептиды флагеллина из рода

Enterococcus могут активировать сильный ответ TLR5, который демонстрирует, что полипептиды флагеллина могут быть полезны в терапии и, в частности, полезны при лечении рака.

Изобретение относится к полипептиду флагеллина из рода *Enterococcus* для применения в способе лечения или профилактики рака. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, изобретение относится к полипептиду флагеллина из вида *Enterococcus gallinarum* для применения в способе лечения или профилактики рака. В предпочтительных вариантах осуществления данного изобретения, изобретение относится к полипептиду флагеллина из штамма MRx0518 для применения в способе лечения или профилактики рака. Примеры демонстрируют, что полипептиды флагеллина из рода *Enterococcus* способны вызывать сильные ответы TLR5, что полезно для лечения и профилактики рака. В частности, примеры демонстрируют, что полипептиды флагеллина из вида *Enterococcus gallinarum* и особенно штамма MRx0518 вызывают очень сильный ответ TLR5.

В предпочтительных вариантах осуществления данного изобретения, изобретение относится к полипептиду флагеллина из вида *Enterococcus gallinarum* или вида *Enterococcus casseliflavus* для применения в терапии, в частности для лечения или профилактики рака. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, полипептид флагеллина происходит от вида *Enterococcus casseliflavus*. В наиболее предпочтительных вариантах осуществления данного изобретения, полипептид флагеллина происходит от видов *Enterococcus gallinarum*.

В примерах были протестированы полипептиды флагеллина из штамма MRx0518. MRx0518 представляет собой штамм бактерии *Enterococcus gallinarum*, депонированный под номером доступа NCIMB 42488. Штамм MRx0518 был депонирован международным депозитарным ведомством NCIMB, Ltd. (Ferguson Building, Абердин, AB21 9YA, Шотландия) компанией 4D Pharma Research Ltd. (Life Sciences Innovation Building, Абердин, AB25 2ZS, Шотландия) 16 ноября 2015 г. как «*Enterococcus sp.*», которому был присвоен номер доступа NCIMB 42488.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, изобретение относится к полипептиду флагеллина с по меньшей мере 75% идентичности последовательности полипептиду флагеллина из штамма MRx0518 и к применению таких полипептидов в терапии и, в частности, при лечении или профилактике рака. Примеры демонстрируют, что такие полипептиды флагеллина особенно эффективны. В частности, изобретение относится к полипептиду флагеллина, имеющему последовательность, идентичную по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 99,9% последовательности SEQ ID NO: 1. Предпочтительно полипептид флагеллина по изобретению содержит или состоит из последовательности SEQ ID NO: 1. В других вариантах осуществления данного изобретения, полипептид флагеллина имеет последовательность, идентичную по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 99,9% последовательности SEQ ID NO: 2. Полипептид флагеллина по изобретению может

содержать или состоять из последовательности SEQ ID NO: 2. Примеры также демонстрируют, что такие полипептиды полезны.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, изобретение относится к полипептиду флагеллина с последовательностью, идентичной по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 99,9% одной из SEQ ID NO: 3-42. В предпочтительных вариантах осуществления данного изобретения, полипептид флагеллина имеет последовательность, идентичную по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 99,9% одной из SEQ ID NO: 3-16. В предпочтительных вариантах осуществления данного изобретения, полипептид флагеллина принадлежит к виду *Enterococcus gallinarum*.

В предпочтительных вариантах осуществления данного изобретения, флагеллин по изобретению связывает TLR5, например, со значением K_D по меньшей мере 10^{-2} , по меньшей мере 10^{-3} , по меньшей мере 10^{-4} , по меньшей мере 10^{-5} , по меньшей мере 10^{-6} , по меньшей мере 10^{-7} , по меньшей мере 10^{-8} , по меньшей мере 10^{-9} , по меньшей мере 10^{-10} , или по меньшей мере 10^{-11} . Связывание с TLR5 можно измерить любым подходящим способом, известным в данной области техники, включая спектроскопию электрохимического импеданса (EIS), сканирующую электрохимическую микроскопию (SECM) [] или анализы с использованием нативного электрофореза в полиакриламидном геле (PAGE) и гель-фильтрационной хроматографии с использованием рекомбинантного белка TLR5 [].

Полипептиды флагеллина по изобретению могут содержать четыре домена: D0, D1, D2 и D3. В предпочтительных вариантах осуществления данного изобретения, полипептид флагеллина не содержит домена D3. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, полипептид флагеллина по изобретению состоит из трех доменов: D0, D1, D2. Расположение доменов D0, D1 и D2 в полипептиде флагеллина *E. gallinarum* показано на Фиг. 3. Предполагаемая форма полипептида флагеллина из штамма MRx0518 (FliC_{MRx0518}) показана на Фиг. 5. Предсказанная структура FliC_{MRx0518} была сгенерирована с использованием инструмента Phyre2, который предсказывает структуру белка на основе гомологии с общедоступными структурами [], а график был создан с помощью пакета UCSF Chimera[]. Прогнозируемое отсутствие домена D3 приводит к изменению конформации в структуре белка по сравнению с полипептидом флагеллина из *S. typhimurium* SL1344 (номер доступа в GenBank CBW17983). Прогнозируемое отсутствие домена D3 может привести к тому, что сайт узнавания TLR5 будет более доступным, что приведет к увеличению способности полипептида флагеллина активировать ответ TLR5. Прогнозируемое отсутствие домена D3 может также влиять на способность полипептида флагеллина полимеризоваться в филамент жгутика. Полипептид флагеллина более эффективно активирует ответы TLR5 в мономерной форме, поэтому предотвращение или уменьшение полимеризации полипептидов флагеллина является полезным.

Полипептиды флагеллина по изобретению могут содержать домен D1, который может потребоваться для узнавания и взаимодействия TLR5. В определенных вариантах осуществления данного изобретения, изобретение относится к полипептиду флагеллина с доменом D1, который имеет по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 99,9%

идентичности последовательности с остатками 43-164 и 273-317 в SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, изобретение относится к полипептиду флагеллина с сайтом узнавания TLR5 в домене D1. Сайт узнавания TLR в полипептидах флагеллина вида *Enterococcus gallinarum* расположен в положениях 87-96 и 290-295 в последовательности SEQ ID NO: 1. В предпочтительных вариантах осуществления данного изобретения, сайт узнавания TLR5 полипептида флагеллина имеет по меньшей мере 99%, 99,5% или 99,9% идентичности с остатками 87-96 и 290-295 в SEQ ID NO: 1. В других предпочтительных вариантах осуществления данного изобретения, полипептид флагеллина содержит сайт узнавания TLR5 с остатками 87-96 и 290-295 в SEQ ID NO: 1.

Полипептид флагеллина по изобретению может также содержать домен D0, который может влиять на передачу сигналов TLR5. В определенных вариантах осуществления данного изобретения, изобретение относится к полипептиду флагеллина с доменом D0, который имеет по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 99,9% идентичности с остатками 2-32 и 234-358 в SEQ ID NO: 1.

Полипептид флагеллина по изобретению может также содержать домен D2. Большая часть вариации последовательности между полипептидами флагеллина из *S. typhimurium* и рода *Enterococcus* расположена в центральном участке (домен D2-D3). Примеры демонстрируют, что полипептиды флагеллина из вида *Enterococcus gallinarum* способны вызывать более сильный ответ TLR5 при более низкой дозировке по сравнению с полипептидом флагеллина из *S. typhimurium*. Вариация последовательности в домене D2 или D3 может вносить вклад в повышенную способность полипептидов флагеллина из вида *Enterococcus gallinarum* активировать ответ TLR5. Полипептид флагеллина по изобретению также содержит домен D0, который может влиять на передачу сигналов TLR5. В определенных вариантах осуществления данного изобретения, изобретение относится к полипептиду флагеллина с доменом D2, который имеет по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 99,9% идентичности с остатками 165-272 в SEQ ID NO: 1.

Полипептид флагеллина может существовать в виде мономера или в полимеризованной форме в виде филамента жгутика. Этот филамент является частью бактериального жгутика. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, полипептид флагеллина по данному изобретению расположен в филаменте жгутика. Изобретение также относится к полипептидам флагеллина, не расположенным в филаменте жгутика. В предпочтительных вариантах осуществления данного изобретения, полипептид флагеллина находится в мономерной форме. Мономерная форма полипептида флагеллина выгодна, поскольку она может более сильно взаимодействовать с TLR5. В вариантах осуществления данного изобретения, флагеллин по изобретению не гликозилирован, чтобы способствовать его отделению и дезагрегации в мономерную форму.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, полипептид флагеллина является частью бактериального жгутика. В некоторых вариантах

осуществления данного изобретения, полипептид флагеллина является частью бактериального жгутика, который содержит один или более белков, выбранных из FliD, FlgL, FlgK, FlgE, FliK, FlgD, FlgG, MotB, MotA, FliF, FliG, FliM, FliN, FlhA FlhB, FliH, FliI, FliO, FliP, FliQ, FliR, FliL, FliJ и FliS. В предпочтительных вариантах осуществления данного изобретения, сборка бактериальных жгутиков содержит FliD, FlgL, FlgK, FlgE, FliK, FlgD, FlgG, MotB, MotA, FliF, FliG, FliM, FliN, FlhA FlhB, FliH, FliI, FliO, FliP, FliQ, FliR, FliL, FliJ и FliS. В определенных вариантах осуществления данного изобретения, сборка бактериальных жгутиков содержит белки FliL и FlaG. FliL является жгутиковым ассоциированным с базальным телом белком, который контролирует направление вращения жгутиков во время хемотаксиса, а FlaG регулирует сборку флагеллина вместе с FlaF. Белки FliL и FlaG присутствуют в MRx0518. Примеры демонстрируют, что полипептид флагеллина из MRx0518 может активировать более сильный ответ TLR5 по сравнению с полипептидом флагеллина из другого вида *Enterococcus gallinarum*.

Полипептиды флагеллина по изобретению можно экспрессировать рекомбинантно или их можно выделить из клеток *Enterococcus*. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, полипептид флагеллина по данному изобретению не присоединен к клетке *Enterococcus*. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, полипептид флагеллина по данному изобретению находится в композиции, которая по существу не содержит бактериальных клеток.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, полипептиды флагеллина по данному изобретению были подвергнуты термообработке и, возможно, денатурированы. Примеры демонстрируют, что такие полипептиды флагеллина все еще очень эффективны. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, полипептиды флагеллина по изобретению термостабильны до 80 °C, например, могут сохранять активность после нагревания до 80°C в течение, например, 40 минут. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, полипептиды флагеллина расщепляются трипсином. Другими словами, в некоторых вариантах осуществления данного изобретения, полипептиды флагеллина содержат сайты расщепления трипсином. Предполагается, что флагеллин MRX518 содержит 36 сайтов расщепления трипсином.

Полипептид флагеллина согласно изобретению не должен функционировать как нормальный полипептид флагеллина, чтобы считаться полипептидом флагеллина. Полипептид флагеллина согласно изобретению может содержать мутации или делеции, которые подавляют определенные активности. Обычно полипептид флагеллина по изобретению является агонистом TLR5. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, полипептиды флагеллина по изобретению не способны полимеризоваться в филаменты жгутика. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, полипептиды флагеллина по данному изобретению не способны образовывать часть сборки бактериальных жгутиков.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, полипептиды по изобретению не являются полипептидами флагеллина. В предпочтительных вариантах

осуществления данного изобретения, полипептиды имеют последовательность, идентичную SEQ ID NO: 1, как указано выше, или содержат или состоят из SEQ ID NO: 1.

Изобретение также относится к композициям, содержащим полипептид флагеллина из рода *Enterococcus* для применения в терапии. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, композиции, содержащие полипептид флагеллина из вида *Enterococcus gallinarum* для применения в терапии. В предпочтительных вариантах осуществления данного изобретения, композиция содержит полипептид флагеллина из штамма MRx0518, для применения в терапии.

В альтернативных аспектах каждого варианта осуществления данного изобретения, полипептид флагеллина по изобретению относится к виду *Enterococcus caselliflavus*. *Enterococcus caselliflavus* очень похож на *Enterococcus gallinarum* и также содержит жгутик.

Фрагменты

Полипептиды флагеллина с последовательностью, идентичной последовательностям, протестированным в примерах, также будут полезны в терапии и охватываются данным изобретением, как изложено в предыдущем разделе. Кроме того, ожидается, что фрагменты полипептидов флагеллина по изобретению также будут полезными.

Предпочтительно любой фрагмент имеет длину по меньшей мере 7, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300 или 350 аминокислот.

Предпочтительные фрагменты содержат один или более из следующих участков аминокислот SEQ ID NO: 1: 2-32, 87-96, 165-272, 234-358, 290-295 или содержат последовательность по меньшей мере на 90%, 92%, 95%, 98% или 99% идентичную последовательности одного из указанных фрагментов.

Предпочтительные фрагменты содержат последовательность, по меньшей мере на 90%, 92%, 95%, 98% или 99% идентичную аминокислотам 165-272 последовательности SEQ ID NO: 1. Дополнительные предпочтительные фрагменты содержат последовательность по меньшей мере на 90%, 92%, 95%, 98% или 99% идентичную последовательности аминокислот 87-96, 165-272 или 290-295 SEQ ID NO: 1 или предпочтительно аминокислотам 87-96, 165-272 и 290-295 SEQ ID NO: 1.

Фрагмент для применения в соответствии с изобретением обычно (i) имеет по меньшей мере $w\%$ идентичности последовательности с последовательностью SEQ ID NO: 1 и/или (ii) содержит фрагмент из по меньшей мере x смежных аминокислот из последовательности SEQ ID NO: 1. Значение w составляет по меньшей мере 85 (например, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или больше). Значение x составляет по меньшей мере 7 (например, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 250, 300), и фрагмент обычно будет включать эпитоп из последовательности SEQ ID NO: 1. Фрагмент обычно может связываться с TLR5.

Другие фрагменты для применения в соответствии с изобретением обычно (i) имеют по меньшей мере $w\%$ идентичности последовательности с SEQ ID NO: 2 и/или (ii) содержат

фрагмент из по меньшей мере x смежных аминокислот из SEQ ID NO: 2. Значение w составляет по меньшей мере 85 (например, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или больше). Значение x по меньшей мере 7 (например, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 250, 300), и фрагмент обычно будет включать эпитоп из последовательности SEQ ID NO: 2. Фрагмент обычно может связываться с TLR5.

Другие фрагменты для применения в соответствии с изобретением обычно (i) имеют по меньшей мере w % идентичности последовательности с одной из SEQ ID NO: 3-42 и/или (ii) содержат фрагмент из по меньшей мере x смежных аминокислот из одной из SEQ ID NO: 3-42. Значение w составляет не менее 85 (например, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или более). Значение x по меньшей мере 7 (например, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 250, 300), и фрагмент обычно будет включать эпитоп из одной из SEQ ID NO: 3-42. Фрагмент обычно может связываться с TLR5.

Слитые белки

Ожидается, что слитые белки, содержащие полипептиды флагеллина по изобретению, также будут полезны в терапии. Следовательно, в определенных вариантах осуществления данного изобретения, изобретение относится к слитому полипептиду, содержащему полипептид флагеллина, как описано выше, необязательно для применения в терапии и, в частности, для применения при лечении рака. Предпочтительные партнеры по слиянию включают нацеливающие фрагменты и фрагменты, предназначенные для продления периода полужизни. В определенных вариантах осуществления данного изобретения, изобретение относится к слитому полипептиду, содержащему полипептид флагеллина, как описано выше, и полипептид, выбранный из группы, состоящей из Fc-области, трансферрина, альбумина, рекомбинантного ПЭГ, полимера гомоаминокислоты, полимера пролин-аланин-серин, эластиноподобного пептида или карбоксиконцевого пептида [СТР - carboxy-terminal peptide; b-цепи хорионического гонадотропина (ХГ)].

Полипептиды флагеллина по данному изобретению также могут быть слиты или конъюгированы с неполипептидными фрагментами для улучшения их характеристик и терапевтического применения. Например, в некоторых вариантах осуществления данного изобретения, изобретение относится к полипептиду флагеллина, как описано выше, ковалентно связанному с ПЭГ или гиалуроновой кислотой.

Полипептиды флагеллина по изобретению могут быть слиты или конъюгированы с антигеном, например, для применения в качестве вакцины. Презентация антигена в непосредственной близости от флагеллина по изобретению может максимизировать их иммуностимулирующую активность и дополнительно усилить защитный иммунный ответ, генерируемый против антигена. Кроме того, производство и доставка терапевтических средств, содержащих антиген и флагеллин по данному изобретению, может быть более эффективным и действенным, когда они слиты или конъюгированы. Следовательно, в определенных вариантах осуществления данного изобретения, изобретение относится к

полипептиду по слиянию, содержащему полипептид флагеллина, как описано выше, и антиген. В дополнительных вариантах осуществления данного изобретения, изобретение относится к полипептиду флагеллина, как описано выше, конъюгированному с антигеном.

Предпочтительными антигенами для включения в слитые белки и конъюгаты по изобретению являются антигены патогенов и опухолевые антигены. Антиген вызовет иммунный ответ, специфичный для антигена, который будет эффективен для защиты от инфицирования патогеном или для атаки опухоли. Антигенами могут быть, например, пептиды или полисахариды. Примеры антигенов для применения со слитыми белками и конъюгатами по изобретению включают: вирусные антигены, такие как вирусные поверхностные белки; бактериальные антигены, такие как белковые и/или сахаридные антигены; грибковые антигены; паразитарные антигены; и опухолевые антигены. Дополнительные антигены для применения со слитыми белками и конъюгатами по данному изобретению включают гликопротеиновые и липогликановые антигены, антигены архей, антиген меланомы E (MAGE - melanoma antigen E), карциноэмбриональный антиген (CEA - Carcinoembryonic antigen), MUC-1, HER2, сиалил-Tn (STn), обратную транскриптазу теломеразы человека (hTERT), ген опухоли Вильмса (WT1), CA-125, простатоспецифический антиген (PSA - prostate-specific antigen), антигены вируса Эпштейна-Барра, неоантигены, онкопротеины, бета-амилоид, Tau, PCSK9 и вещества, вызывающие привыкание, например никотин, алкоголь или опиаты.

Слитые полипептиды по изобретению могут включать линкерную последовательность между флагеллином и антигеном. Предпочтительные линкерные последовательности включают пептиды, которые содержат мотив(ы) (Gly4)_n, мотив(ы) (Gly4Ser)_n и мотив(ы) Ser(Gly4Ser)_n. Линкерные последовательности могут иметь длину 1-50, 1-30, 1-20, 5-20, 5-10 или 10-20 аминокислот. Линкерные последовательности позволят флагеллину и партнеру по слиянию, например, антигену, выполнять свои роли и, например, быть доступными для иммунной системы. Следовательно, в некоторых вариантах осуществления данного изобретения, изобретение относится к слитому полипептиду, содержащему полипептид флагеллина, как описано выше, линкерную последовательность и антиген, такой как антиген, полученный из патогена, или опухолевый антиген.

Полипептиды флагеллина по изобретению могут быть особенно полезны при конъюгировании с неполипептидными частями, такими как полисахаридные антигены. Подходящие способы конъюгации включают использование карбодиимидов, гидразидов, активных сложных эфиров, норборана, п-нитробензойной кислоты, N-гидроксисукцинимиды, S-NHS, EDC, CDAP или TSTU.

Полинуклеотиды

Изобретение также относится к полинуклеотидной последовательности, которая кодирует полипептид флагеллина из рода *Enterococcus*, для применения в терапии. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, полинуклеотидная последовательность кодирует полипептид флагеллина из вида *Enterococcus gallinarum* для применения в терапии. В предпочтительных вариантах осуществления данного

изобретения, полинуклеотидная последовательность кодирует полипептид флагеллина из штамма MRx0518 для применения в терапии. Примеры демонстрируют, что полипептиды флагеллина из рода *Enterococcus* могут активировать сильный ответ TLR5, поэтому полинуклеотиды, кодирующие такие полипептиды флагеллина, могут быть полезны в терапии и, в частности, полезны при лечении рака.

Изобретение также относится к полинуклеотидной последовательности, которая кодирует полипептид флагеллина из рода *Enterococcus* для применения в способе лечения или профилактики рака. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, изобретение относится к полинуклеотидной последовательности, которая кодирует полипептид флагеллина из вида *Enterococcus gallinarum* для применения в способе лечения или профилактики рака. В предпочтительных вариантах осуществления данного изобретения, изобретение относится к полинуклеотидной последовательности, которая кодирует полипептид флагеллина из штамма MRx0518 для применения в способе лечения или профилактики рака. Примеры демонстрируют, что полипептид флагеллина из рода *Enterococcus* способен вызывать сильные ответы TLR5, что полезно для лечения и профилактики рака. В частности, примеры демонстрируют, что полипептиды флагеллина из вида *Enterococcus gallinarum* и особенно штамма MRx0518 вызывают очень сильный ответ TLR5.

В предпочтительных вариантах осуществления данного изобретения, полинуклеотид по изобретению для применения в терапии кодирует последовательность SEQ ID NO: 1 или полипептидную последовательность с 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 99,9% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1. В дополнительных предпочтительных вариантах осуществления данного изобретения, полинуклеотид по изобретению кодирует флагеллин с конкретными последовательностями D0, D1 и/или D2, изложенными выше, которые продемонстрированы в примерах как полезные.

В других вариантах осуществления данного изобретения, полинуклеотид по изобретению для применения в терапии кодирует SEQ ID NO: 2 или полипептидную последовательность с 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 99,9% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 2. В дополнительных предпочтительных вариантах осуществления данного изобретения, полинуклеотид по изобретению кодирует флагеллин с конкретными последовательностями D0, D1 и/или D2, изложенными выше, которые продемонстрированы в примерах как полезные.

В других вариантах осуществления данного изобретения, полинуклеотид по изобретению для применения в терапии кодирует одну из SEQ ID NO: 3-42 или полипептидную последовательность с 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 99,9% идентичности последовательности с одной из SEQ ID NO: 3-42. В дополнительных предпочтительных вариантах осуществления данного изобретения, полинуклеотид по изобретению кодирует флагеллин с конкретными последовательностями D0, D1 и/или D2, изложенными выше, которые продемонстрированы в примерах как

полезные.

Нуклеиновая кислота согласно изобретению может принимать различные формы (например, одноцепочечные, двухцепочечные, векторы и т. д.). Нуклеиновые кислоты по изобретению могут быть кольцевыми или разветвленными, но обычно линейными.

Термин «полинуклеотид» или «нуклеиновая кислота» включает как одноцепочечные, и двухцепочечные нуклеотидные полимеры. Нуклеотиды, составляющие нуклеиновую кислоту, могут представлять собой рибонуклеотиды или дезоксирибонуклеотиды, или модифицированную форму любого типа нуклеотидов. Указанные модификации включают модификации оснований, такие как производные бромуридина и инозина, модификации рибозы, такие как 2',3'-дидеоксирибоза, и модификации межнуклеотидных связей, такие как фосфотиоат, фосфодитиоат, фосфоселеноат, фосфодиселеноат, фосфоанилотиоат, фосфоаниладат и фосфоамидат.

Нуклеиновые кислоты можно получить разными способами, например путем химического синтеза (например, фосфорамидитный синтез ДНК) полностью или частично, путем расщепления более длинных нуклеиновых кислот с использованием нуклеаз (например, рестрикционных ферментов), путем объединения более коротких нуклеиновых кислот или нуклеотидов (например, с использованием лигаз или полимераз) из геномных библиотек или библиотек кДНК, и т.п.

Нуклеиновые кислоты по изобретению содержат последовательность, которая кодирует по меньшей мере один полипептид по изобретению, такой как полипептид флагеллина по изобретению. Обычно нуклеиновые кислоты по изобретению находятся в рекомбинантной форме, то есть в форме, которая не встречается в природе. Например, нуклеиновая кислота может содержать одну или более гетерологичных последовательностей нуклеиновых кислот (например, последовательность, кодирующую другой антиген и/или контрольную последовательность, такую как промотор или внутренний сайт входа в рибосому) в дополнение к последовательности, кодирующей по меньшей мере полипептид флагеллина. В таких вариантах осуществления данного изобретения, нуклеиновая кислота по изобретению кодирует полипептид флагеллина, как обсуждалось выше, и антиген, такой как антиген патогена или опухолевый антиген. Необязательно, нуклеиновая кислота также кодирует линкерную последовательность.

Клетки-хозяева

Изобретение также относится к клеткам-хозяевам, которые экспрессируют полипептид флагеллина по изобретению для применений в терапии. Примеры демонстрируют, что штаммы *Enterococcus*, такие как MRx0518, которые экспрессируют флагеллин *Enterococcus* по изобретению, могут активировать TLR5 и, следовательно, могут иметь выраженные терапевтические эффекты. Клетки-хозяева, экспрессирующие полипептиды флагеллина по изобретению, могут быть полезны для получения полипептида флагеллина для включения в терапевтическую композицию, или такие клетки-хозяева могут быть полезными для введения пациенту, где они экспрессируют полипептид флагеллина для оказания прямого терапевтического эффекта.

В предпочтительных вариантах осуществления данного изобретения, клетка-хозяин по данному изобретению рекомбинантно экспрессирует полипептид флагеллина по данному изобретению. Другими словами, клетка-хозяин по данному изобретению содержит гетерологичную полинуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид флагеллина по данному изобретению. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, клетка-хозяин не принадлежит к роду *Enterococcus*, не относится к виду *Enterococcus gallinarum* или не относится к штамму MRx0518. В предпочтительных вариантах осуществления данного изобретения, клетка-хозяин для экспрессии рекомбинантных полипептидов флагеллина *Enterococcus* представляет собой *E. coli*.

В альтернативных вариантах осуществления данного изобретения, где, например, клетка-хозяин предназначена для введения пациенту, клетка-хозяин представляет собой пробиотический штамм, такой как штамм *Lactobacillus* или *Bifidobacterium*.

В определенных вариантах осуществления данного изобретения, клетка-хозяин содержит последовательность полинуклеотида, которая кодирует полипептид флагеллина из рода *Enterococcus*. В определенных вариантах осуществления данного изобретения, клетка-хозяин содержит последовательность полинуклеотида, которая кодирует полипептид флагеллина из вида *Enterococcus gallinarum*. В определенных вариантах осуществления данного изобретения, клетка-хозяин содержит последовательность полинуклеотида, которая кодирует полипептид флагеллина из штамма MRx0518. В определенных вариантах осуществления данного изобретения, клетка-хозяин содержит вектор, при этом вектор содержит полинуклеотидную последовательность, которая кодирует полипептид флагеллина из рода *Enterococcus*.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, клетка-хозяин содержит полинуклеотидную последовательность, которая кодирует один или более, предпочтительно все, гены сборки бактериальных жгутиков FliD, FlgL, FlgK, FlgE, FliK, FlgD, FlgG, MotB, MotA, FliF, FliG, FliM, FliN, FlhA FlhB, FliH, FliI, FliO, FliP, FliQ, FliR, FliL, FliJ и FliS. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, клетка-хозяин по изобретению экспрессирует один или более, предпочтительно все полипептиды FliD, FlgL, FlgK, FlgE, FliK, FlgD, FlgG, MotB, MotA, FliF, FliG, FliM, FliN, FlhA FlhB, FliH, FliI, FliO, FliP, FliQ, FliR, FliL, FliJ и FliS. В предпочтительных вариантах осуществления данного изобретения, клетка-хозяин содержит последовательность полинуклеотида, которая кодирует сборку бактериальных жгутиков, содержащую FliL и FlaG. В предпочтительных вариантах осуществления данного изобретения, клетка-хозяин по данному изобретению экспрессирует полипептиды FliL и FlaG.

Предпочтительно любая клетка, экспрессирующая полипептид флагеллина по изобретению, и в частности любая клетка для введения пациенту, эффективна в отделении полипептида флагеллина. Примеры демонстрируют, что такие клетки вызывают более сильный ответ TLR5. Флагеллин может «активно» отделяться во время сборки жгутика из-за утечки его мономерных единиц. Однако в большинстве случаев мономерный флагеллин возникает в результате пассивной деградации отделившихся жгутиков. Отделение жгутика

может происходить как в результате механического напряжения, так и в результате произвольного процесса. У некоторых видов бактерий флагеллин гликозилирован для повышения стабильности филаментов и предотвращения неконтролируемого отделения, например, у *Shewanella oneidensis* []. В предпочтительных вариантах осуществления данного изобретения, флагеллин, экспрессируемый клеткой-хозяином, не гликозилирован, чтобы способствовать его отделению и дезагрегации в мономерную форму.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, полипептид флагеллина и/или сборка бактериальных жгутиков по данному изобретению легко отделяется от клетки-хозяина.

Легкость отделения полипептидов флагеллина и/или сборок жгутиков может быть определена путем раздельного роста i) клеток, экспрессирующих флагеллин по изобретению, и ii) одной или более клеток (например, 1, 2, 3, 4, 5, 10 или более 10), экспрессирующих эталонные флагеллины, полученные из того же или разных штаммов, принадлежащих к тем же видам бактерий, что и флагеллин по данному изобретению а) в стационарной фазе в течение 18 часов с использованием 1% инокулята соответствующих клеток, затем б) поздней лог-фазе, в которой 10% инокулята клеток из стационарной фазы выращивают в течение 3 часов. Затем 10 мл культур клеток, экспрессирующих флагеллин по данному изобретению, и клеток, экспрессирующих эталонные флагеллины, можно центрифугировать при $5000 \times g$ в течение 5 минут при комнатной температуре для удаления бактериального осадка. Затем полученные супернатанты можно отфильтровать (0,22 мкм) в стерильных условиях. В вариантах осуществления данного изобретения, в которых полипептид флагеллина и/или сборка бактериального жгутика по изобретению является хорошо отделяемыми, концентрация белка флагеллина в супернатанте, полученном из клеток, экспрессирующих флагеллин по данному изобретению, будет выше (например, в 1,5 раза или выше, 2X или выше, 3X или выше, 4X или выше, 5X или выше, 7X или выше или 10X или выше), чем концентрация белка флагеллина в супернатанте(ах), полученном из клеток, экспрессирующих эталонные флагеллины.

В предпочтительных вариантах осуществления данного изобретения, клетка-хозяин по изобретению высвобождает полипептиды флагеллина и/или самосборки жгутиков в свою окружающую среду с необходимостью химического или физического разрушения. В предпочтительных вариантах осуществления данного изобретения, культивирование клетки-хозяина по изобретению в условиях, подходящих для экспрессии полипептида флагеллина, приводит к высвобождению полипептида флагеллина из клетки в окружающую среду. Примеры демонстрируют, что клетки, экспрессирующие полипептиды флагеллина по изобретению, вызывают более сильный ответ TLR5. В других вариантах осуществления данного изобретения, клетки-хозяева по данному изобретению являются хорошими отделителями сборок бактериальных жгутиков. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, клетки-хозяева по данному изобретению хорошо отделяют филаменты жгутика бактерий и, в частности, хорошо отделяют полипептиды флагеллина. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, сборка

бактериального жгутика по данному изобретению активно отделяет мономерный флагеллин. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, филамент жгутика согласно изобретению активно отделяет мономерный флагеллин. Мономерный флагеллин более эффективен в индукции ответов TLR5.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, изобретение относится к способу получения полипептида флагеллина или сборки жгутика по изобретению, включающему культивирование клетки, экспрессирующей полипептид флагеллина или сборку жгутиков по изобретению, и культивирование указанного полипептида флагеллина или сборки жгутика без выполнения каких-либо шагов по удалению отдельного полипептида флагеллина или сборки жгутиков с поверхности клетки.

Процесс отделения жгутика (или флагеллина) в настоящее время не связан с экспрессией определенного подмножества генов и, вероятно, находится под сильным влиянием условий окружающей среды. Однако было показано, что ряд генов участвует в жесткости и стабильности жгутика. Например, у *Salmonella* мутанты *fliF* и *fliL* легче отделяют жгутики при выращивании в вязкой среде [1]. В обоих случаях жгутики ломались возле дистального стержня [2]. Таким образом, в предпочтительных вариантах осуществления данного изобретения, клетка-хозяин не экспрессирует *fliF* и/или *fliL*. В других вариантах осуществления данного изобретения, клетка-хозяин экспрессирует *fliL*.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, клетки-хозяева по изобретению были подвергнуты термообработке. Примеры демонстрируют, что клетки, экспрессирующие полипептиды флагеллина по данному изобретению, по-прежнему обладают высокой эффективностью после тепловой обработки. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, клетки-хозяева по изобретению термостабильны до 80 °C, например, могут сохранять активность после нагревания до 80°C в течение, например, 40 минут.

В изобретении также предложены способы получения полипептидов флагеллина по изобретению путем культивирования клеток-хозяев в условиях, позволяющих продуцировать полипептиды флагеллина, и извлекать полученные таким образом полипептиды флагеллина.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, клетки-хозяева по изобретению дополнительно экспрессируют один или более антигенов. Обычно антиген экспрессируется рекомбинантно и гетерологичен клетке-хозяину. Антиген может быть частью слитого полипептида, экспрессируемого с полипептидом флагеллина по изобретению, или клетка-хозяин может отдельно экспрессировать флагеллин и антиген из разных открытых рамок считывания. Таким образом, изобретение относится к клетке-хозяину, которая экспрессирует полипептид флагеллина по изобретению и гетерологичный антиген. Примеры антигенов для применения в изобретении включают: вирусные антигены, такие как вирусные поверхностные белки; бактериальные антигены, такие как белковые и/или сахаридные антигены; грибковые антигены; паразитарные антигены; и опухолевые антигены. Дополнительные антигены для экспрессии в клетке-хозяине с

флагеллином по изобретению включают гликопротеиновые и липогликановые антигены, антигены архей, антиген меланомы E (MAGE - melanoma antigen E), карциноэмбриональный антиген (CEA - Carcinoembryonic antigen), MUC-1, HER2, сиалил-Tn (STn), обратную транскриптазу теломеразы человека (hTERT), ген опухоли Вильмса (WT1), CA-125, простатоспецифический антиген (PSA - prostate-specific antigen), антигены вируса Эпштейна-Барра, неоантигены, онкопротеины, бета-амилоид, Тау, PCSK9 и вещества, вызывающие привыкание, например никотин, алкоголь или опиаты.

Векторы, плазмиды и другие нуклеиновые кислоты

Нуклеиновая кислота по данному изобретению может быть частью вектора, то есть частью конструкции нуклеиновой кислоты, предназначенной для трансдукции/трансфекции одного или более типов клеток. Векторы могут быть, например, «экспрессионными векторами», которые предназначены для экспрессии нуклеотидной последовательности в клетке-хозяине, или «вирусными векторами», которые предназначены для получения рекомбинантного вируса или вирусоподобной частицы.

Альтернативно или дополнительно, последовательность или химическая структура нуклеиновой кислоты может быть модифицирована по сравнению с природной последовательностью, которая кодирует полипептид флагеллина. Последовательность молекулы нуклеиновой кислоты может быть модифицирована, например для повышения эффективности экспрессии или репликации нуклеиновой кислоты или для обеспечения дополнительной стабильности или устойчивости к деградации. Например, последовательность молекулы нуклеиновой кислоты может быть оптимизирована по кодонам для экспрессии в желаемом хозяине, таком как клетка млекопитающего (например, человека). Такая модификация по отношению к использованию кодонов может увеличить эффективность трансляции и время полужизни нуклеиновой кислоты. Поли-А-хвост (например, из около 30 остатков аденозина или более) может быть присоединен к 3'-концу РНК для увеличения ее периода полужизни. 5'-конец РНК может быть кэпирован модифицированным рибонуклеотидом со структурой m7G (5') ppp (5') N (структура кэп 0) или ее производным, которое может быть включено во время синтеза РНК или может быть сконструировано ферментативно после транскрипции РНК (например, с помощью использования кэпирующего фермента вируса осповакцины (VCE - Vaccinia Virus Capping Enzyme), состоящего из мРНК трифосфатазы, гуанилилтрансферазы и гуанин-7-метилтрансферазы, который катализирует конструирование структур N7-мометилированного кэпа 0). Структура кэп 0 играет важную роль в поддержании стабильности и трансляционной эффективности молекулы РНК. 5'-кэп молекулы РНК может быть дополнительно модифицирована 2'-О-метилтрансферазой, что приводит к генерированию структуры кэп 1 (m7Gppp [m2'-O] N), что может дополнительно повысить эффективность трансляции.

Нуклеиновые кислоты могут содержать один или более аналогов нуклеотидов или модифицированных нуклеотидов. Используемый в данном документе термин «аналог нуклеотида» или «модифицированный нуклеотид» относится к нуклеотиду, который

содержит одну или более химических модификаций (например, замен) в азотистом основании нуклеозида или на нем (например, цитозин (C), тимин (T) или урацил (U)), аденин (A) или гуанин (G)). Аналог нуклеотида может содержать дополнительные химические модификации сахарного фрагмента нуклеозида в или на нем (например, рибоза, дезоксирибоза, модифицированная рибоза, модифицированная дезоксирибоза, шестичленный аналог сахара или аналог сахара с открытой цепью) или фосфата. Получение нуклеотидов и модифицированных нуклеотидов и нуклеозидов хорошо известно в данной области техники, например, из патентов США под номерами 4373071, 4458066, 4500707, 4668777, 4973679, 5047524, 5132418, 5153319, 5262530, 5700642, и многие модифицированные нуклеозиды и модифицированные нуклеотиды являются коммерчески доступными.

Изобретение также относится к рекомбинантным экспрессионным векторам, способным экспрессировать полипептид флагеллина. Например, изобретение относится к рекомбинантным векторам экспрессии, содержащим любую из молекул нуклеиновой кислоты, упомянутых выше.

Изобретение также относится к клеткам-хозяевам, в которые был введен любой из векторов, упомянутых выше. В изобретении также предложены способы получения полипептидов флагеллина по изобретению путем культивирования клеток-хозяев в условиях, позволяющих продуцировать полипептиды флагеллина, и восстанавливать полученные таким образом полипептиды флагеллина.

Композиция, описанная в данном документе, содержащая последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует полипептиды флагеллина, может быть терапевтическим средством на основе нуклеиновой кислоты.

Нуклеиновая кислота может, например, представлять собой РНК (т.е. терапевтическое средство на основе РНК) или ДНК (т.е. терапевтическое средство на основе ДНК, такое как терапевтическое средство на основе плазмидной ДНК). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, терапевтическое средство на основе нуклеиновой кислоты представляет собой терапевтическое средство на основе РНК. В определенных вариантах осуществления данного изобретения, терапевтическое средство на основе РНК включает самореплицирующуюся молекулу РНК. Самореплицирующаяся молекула РНК может быть РНК-репликоном, полученными от альфавируса.

Самореплицирующиеся молекулы РНК хорошо известны в данной области техники и могут быть получены с использованием элементов репликации, полученных, например, из альфавирусов, и замены структурных вирусных белков нуклеотидной последовательностью, кодирующей интересующий белок. Самореплицирующаяся молекула РНК обычно представляет собой молекулу+цепи, которая может быть непосредственно транслирована после доставки в клетку, и эта трансляция обеспечивает РНК-зависимую РНК-полимеразу, которая затем продуцирует как антисмысловые, так и смысловые транскрипты из доставленной РНК. Таким образом, доставленная РНК приводит к образованию множества дочерних РНК. Эти дочерние РНК, а также

коллинеарные субгеномные транскрипты могут транслироваться сами по себе, чтобы обеспечить экспрессию *in situ* кодируемого антигена (т.е. полипептида флагеллина), или могут быть транскрибированы для обеспечения дополнительных транскриптов с той же смысловой последовательностью, что и доставленная РНК, которые транслируются для обеспечения экспрессии антигена *in situ*. Общий результат этой последовательности транскрипции - это массивная амплификация в количестве введенных РНК-репликонов, и поэтому кодируемый антиген становится основным полипептидным продуктом клеток.

Одной из подходящих систем для достижения саморепликации таким образом является использование репликона на основе альфавируса. Эти репликоны представляют собой +цепочечные РНК, которые приводят к трансляции репликазы (или репликазы-транскриптазы) после доставки в клетку. Репликаза транслируется как полипротеин, который автоматически расщепляется с образованием репликационного комплекса, который создает копии геномной -цепи для +цепи доставленной РНК. Эти -цепочечные транскрипты могут сами транскрибироваться с получением дополнительных копий +цепочечной родительской РНК, а также для получения субгеномного транскрипта, который кодирует антиген. Таким образом, трансляция субгеномного транскрипта приводит к экспрессии антигена *in situ* инфицированной клеткой. Подходящие репликоны альфавирусов могут использовать репликазу из вируса Синдбис, вируса леса Семлики, вируса восточного энцефалита лошадей, вируса венесуэльского энцефалита лошадей и т.д. Могут быть использованы последовательности мутантного вируса или вируса дикого типа, например, аттенуированный мутант TC83 VEEV был использован в репликонах.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, самореплицирующаяся молекула РНК, описанная в данном документе, кодирует (i) РНК-зависимую РНК-полимеразу, которая может транскрибировать РНК из самореплицирующейся молекулы РНК, и (ii) полипептид флагеллина. Полимераза может представлять собой репликазу альфавируса, например, содержащую один или более из альфавирусных белков nsP1, nsP2, nsP3 и nsP4.

Терапевтическое средство на основе нуклеиновой кислоты может включать вирусную или невирусную систему доставки. Система доставки (также называемая в данном документе носителем для доставки) может обладать адъювантными эффектами, которые повышают иммуногенность кодируемого полипептида флагеллина. Например, молекула нуклеиновой кислоты может быть инкапсулирована в липосомы, нетоксичные биоразлагаемые полимерные микрочастицы или вирусные частицы репликона (VRP - viral replicon particle), или может быть объединена в комплекс с частицами катионной эмульсии масло-в-воде. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, терапевтическое средство на основе нуклеиновой кислоты содержит систему доставки катионной наноэмульсии (CNE - cationic nano-emulsion) или систему доставки липидных наночастиц (LNP - lipid nanoparticle). Альтернативно, терапевтическое средство на основе нуклеиновой кислоты может содержать репликон вирусных частиц. В других вариантах осуществления данного изобретения, терапевтическое средство на основе нуклеиновой

кислоты может содержать «голую» нуклеиновую кислоту, такую как «голая» РНК (например, мРНК), но предпочтительна доставка посредством LNP.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, терапевтическое средство на основе нуклеиновой кислоты содержит систему доставки катионных наноэмульсий (CNE). Системы доставки CNE и способы их получения описаны в уровне техники. В системе доставки CNE молекула нуклеиновой кислоты (например, РНК), которая кодирует антиген, образует комплекс с частицей катионной эмульсии масло-в-воде. Катионные эмульсии масло-в-воде можно использовать для доставки в клетки отрицательно заряженных молекул, таких как молекула РНК. Частицы эмульсии содержат масляное ядро и катионный липид. Катионный липид может взаимодействовать с отрицательно заряженной молекулой, тем самым закоривая молекулу на частицах эмульсии. Дополнительные сведения о полезных CNE можно найти в данной области техники.

Таким образом, в терапевтическом средстве на основе нуклеиновой кислоты по данному изобретению молекула РНК, кодирующая полипептид флагеллина, может образовывать комплекс с частицей катионной эмульсии масло-в-воде. Частицы обычно содержат масляное ядро (например, растительного масла или сквалена), которое находится в жидкой фазе при 25 °C, катионный липид (например, фосфолипид) и, необязательно, поверхностно-активное вещество (например, триолеат сорбитана, полисорбат 80); полиэтиленгликоль также может быть включен. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, CNE включает сквален и катионный липид, такой как 1,2-диолеоилокси-3-(триметиламмоний)пропан (DOTAP). В некоторых предпочтительных вариантах осуществления данного изобретения, система доставки представляет собой невирусную систему доставки, такую как CNE, и терапевтическое средство на основе нуклеиновой кислоты содержит самореплицирующуюся РНК (мРНК). Это может быть особенно эффективным для индукции гуморальных и клеточных иммунных ответов. К преимуществам также относятся отсутствие ограничивающего иммунного ответа против векторов и отсутствие риска геномной интеграции.

Системы доставки LNP и нетоксичные биоразлагаемые полимерные микрочастицы и способы их получения описаны в данной области техники. LNP - это частицы липосом без вириона, в которые может быть инкапсулирована молекула нуклеиновой кислоты (например, РНК). Частицы могут включать некоторую внешнюю РНК (например, на поверхности частиц), но по меньшей мере половина РНК (а в идеале вся она) инкапсулирована. Липосомные частицы могут, например, состоять из смеси цвиттерионных, катионных и анионных липидов, которые могут быть, например, насыщенными или ненасыщенными; DSPC (цвиттерионный, насыщенный), DlinDMA (катионный, ненасыщенный) и/или DMG (анионный, насыщенный). Предпочтительные LNP для применения в изобретении включают амфифильный липид, который может образовывать липосомы, необязательно в комбинации по меньшей мере с одним катионным липидом (таким как DOTAP, DSDMA, DODMA, DlinDMA, DLenDMA и т.д.). Смесь DSPC,

DlinDMA, PEG-DMG и холестерина особенно эффективна. Другие полезные LNP описаны в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, LNP представляют собой липосомы RV01.

NF-κB

Сигнальные пути TLR завершаются активацией ядерного фактора транскрипционного фактора-каппаВ (NF-κB). NF-κB контролирует экспрессию ряда генов воспалительных цитокинов, включая TNF-α. Флагеллин индуцирует димеризацию TLR5, которая впоследствии рекрутирует MyD88 и активирует протеинкиназы, включая IRAK1, IRAK2, IRAK4 и IRAK-M. Активация этих киназ приводит к ядерной локализации NF-κB, который является провоспалительным цитокином [1].

Как показано в примерах (Фиг. 18), композиции по данному изобретению приводят к увеличению экспрессии NF-κB. Поскольку введение композиций по изобретению увеличивает экспрессию провоспалительного цитокина NF-κB, композиции по данному изобретению могут быть полезны для стимуляции иммунного ответа. Кроме того, композиции по изобретению могут быть полезны при лечении заболеваний, в частности заболеваний, характеризующихся пониженной активацией иммунной системы, и/или заболеваний, которые излечиваются с помощью повышенного иммунного ответа. В одном варианте осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для применения в качестве иммуностимулятора за счет повышения уровня и/или активности NF-κB. В одном варианте осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для лечения заболеваний, характеризующихся сниженной иммунной активацией, за счет повышения уровня и/или активности NF-κB. В одном варианте осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для лечения заболеваний, которые лечатся с помощью повышенного иммунного ответа, путем повышения уровня и/или активности NF-κB.

В частности, композиции по изобретению могут быть полезны при лечении заболеваний, характеризующихся снижением экспрессии и/или активации NF-κB. В одном варианте осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для лечения заболеваний, характеризующихся снижением экспрессии и/или активации NF-κB.

Активация NF-κB важна для вызова врожденных иммунных ответов и последующего развития адаптивных иммунных ответов. Таким образом, агонисты TLR, такие как флагеллин, вероятно, будут полезны в качестве адъювантов для лечения инфекционных заболеваний, аллергии и опухолей, способствуя как врожденным, так и адаптивным иммунным ответам [44]. В одном варианте осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для лечения инфекционных заболеваний, аллергии и/или опухолей. В одном варианте осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для лечения инфекционных заболеваний, аллергии и/или опухолей путем повышения уровня и/или

активности NF-κB.

Лечение рака

Толл-подобные рецепторы (TLR - Toll-like receptor) представляют собой мембраносвязанные рецепторы, в первую очередь экспрессируемые на клетках врожденного иммунитета, которые играют ключевую роль как во врожденной, так и в адаптивной иммунной системе. TLR отвечают на специфические молекулярные паттерны, связанные с микробными патогенами (PAMP - pathogen-associated molecular patterns). TLR воспринимают компоненты стенки бактериальной клетки, а TLR5, как известно, распознает бактериальный флагеллин. Флагеллин является единственным известным лигандом для TLR5, рецепторного белка, экспрессируемого на поверхности ряда клеток человека, включая эпителиальные клетки, эндотелиальные клетки, макрофаги, дендритные клетки (ДК) и Т-клетки [-]. Активация TLR5 бактериальным флагеллином приводит к активации множества провоспалительных генов и генов иммунного ответа [15].

Известно, что активация TLR5 флагеллином *S. typhimurium* подавляет пролиферацию клеток и рост опухоли []. Было показано, что штамм *S. typhimurium*, сконструированный для секреции флагеллина В *Vibrio vulnificus* (FlaB), эффективно подавляет рост опухоли и метастазирование на моделях мышей и увеличивает выживаемость за счет двухэтапной активации сигнальных путей TLR4 и TLR5, []. Эффективность полипептидов флагеллина других видов для лечения рака неизвестна. Анализ способности соединения активировать ответ TLR5 демонстрирует, что соединение может быть эффективным при лечении рака.

Композиции, содержащие штаммы *Enterococcus gallinarum*, в частности штамм MRx0518, эффективны при лечении и профилактике рака []. Авторы изобретения неожиданно показали, что полипептиды флагеллина из вида *Enterococcus gallinarum* способны стимулировать сильный ответ TLR5, который может способствовать противораковой активности штаммов *Enterococcus*. Полипептиды флагеллина из *Enterococcus gallinarum* имеют большую несхожесть последовательностей с полипептидами флагеллина из *S. typhimurium*. Примеры показывают, что полипептиды флагеллина из вида *Enterococcus gallinarum* способны вызывать более сильный ответ TLR5, чем полипептиды флагеллина из *S. typhimurium*. Таким образом, изобретатели показали, что полипептиды флагеллина из рода *Enterococcus* и, в частности, вида *Enterococcus gallinarum* полезны в терапии и особенно эффективны при лечении и профилактике рака.

Было показано, что TLR5 экспрессируется рядом различных злокачественных новообразований, включая рак молочной железы, колоректальный рак и рак желудка. Примеры демонстрируют, что полипептиды флагеллина из рода *Enterococcus* способны вызвать сильный ответ TLR5. Следовательно, в некоторых вариантах осуществления данного изобретения, изобретение относится к полипептидам флагеллина из рода *Enterococcus* для применения при лечении или профилактике рака молочной железы, колоректального рака или рака желудка. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, изобретение относится к композициям, содержащим полипептиды

флагеллина из рода *Enterococcus* для применения при лечении или профилактике рака молочной железы, колоректального рака или рака желудка. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для применения для уменьшения размера опухоли, уменьшении роста опухоли или уменьшении ангиогенеза при раке молочной железы, колоректальном раке или раке желудка. В предпочтительном варианте осуществления данного изобретения, изобретение относится к композиции, содержащей полипептиды флагеллина из вида *Enterococcus gallinarum*, для применения при лечении рака молочной железы. В предпочтительном варианте осуществления данного изобретения, изобретение относится к композиции, содержащей полипептиды флагеллина из вида *Enterococcus gallinarum*, для применения при лечении колоректального рака. В предпочтительном варианте осуществления данного изобретения, изобретение относится к композиции, содержащей полипептиды флагеллина из вида *Enterococcus gallinarum*, для применения при лечении рака желудка.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, изобретение относится к композициям, содержащим полипептиды флагеллина из рода *Enterococcus* для применения при лечении или профилактике злокачественных новообразований, связанных с TLR5.

Изобретение обеспечивает полипептид флагеллина из рода *Enterococcus* для применения при лечении или профилактике рака. Изобретение обеспечивает полипептид флагеллина из рода *Enterococcus* для применения при лечении или профилактике рака. Более предпочтительно изобретение относится к полипептиду флагеллина из штамма MRx0518, в частности с последовательностью SEQ ID NO: 1, для применения при лечении или профилактике рака.

Изобретение также относится к композициям, содержащим полипептиды флагеллина по изобретению. Изобретение также относится к композициям, содержащим полинуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид флагеллина по изобретению. Изобретение также относится к клетке-хозяину, которая экспрессирует полипептид флагеллина по изобретению. Кроме того, изобретение также относится к композициям, содержащим клетку-хозяин, при этом клетка-хозяин содержит полинуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид флагеллина по изобретению.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, лечение композициями по изобретению приводит к уменьшению размера опухоли или уменьшению роста опухоли. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для уменьшения размера опухоли или уменьшения роста опухоли. Композиции по изобретению могут быть эффективными для уменьшения размера или роста опухоли. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для лечения пациентов с солидными опухолями. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для применения для уменьшения или

предотвращения ангиогенеза при лечении рака. Композиции по данному изобретению могут оказывать влияние на иммунную или воспалительную системы, которые играют центральную роль в ангиогенезе. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, композиции по изобретению предназначены для предотвращения метастазирования.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для применения при лечении или профилактике рака молочной железы. Ссылка [50] демонстрирует, что штаммы *Enterococcus* обладают сильным действием против рака молочной железы, поэтому, согласно данным, приведенным в данной заявке, полипептиды флагеллина по изобретению могут быть особенно эффективными против рака молочной железы. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для применения для уменьшения размера опухоли, уменьшения роста опухоли или уменьшения ангиогенеза при лечении рака молочной железы. В предпочтительных вариантах осуществления данного изобретения, рак представляет собой карциному молочной железы. В предпочтительных вариантах осуществления данного изобретения, рак представляет собой рак молочной железы IV стадии.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для применения при лечении или профилактике рака легкого. Ссылка [50] демонстрирует, что штаммы *Enterococcus* обладают сильным действием против рака легкого, поэтому, согласно данным, приведенным в данной заявке, полипептиды флагеллина по изобретению могут быть особенно эффективными против рака легкого. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для применения для уменьшения размера опухоли, уменьшения роста опухоли или уменьшения ангиогенеза при лечении рака легкого. В предпочтительных вариантах осуществления данного изобретения, рак представляет собой карциному легкого.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для применения при лечении или профилактике рака печени. Ссылка [50] демонстрирует, что штаммы *Enterococcus* обладают сильным действием против рака печени, поэтому, согласно данным, приведенным в данной заявке, полипептиды флагеллина по изобретению могут быть особенно эффективными против рака печени. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для применения для уменьшения размера опухоли, уменьшения роста опухоли или уменьшения ангиогенеза при лечении рака печени. В предпочтительных вариантах осуществления данного изобретения, рак представляет собой гепатому (гепатоцеллюлярную карциному).

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для применения при лечении или профилактике колоректального рака. Ссылка [50] демонстрирует, что штаммы *Enterococcus* обладают

сильным действием против колоректального рака, поэтому, согласно данным, приведенным в данной заявке, полипептиды флагеллина по изобретению могут быть особенно эффективными против колоректального рака. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для применения для уменьшения размера опухоли, уменьшения роста опухоли или уменьшения ангиогенеза при лечении колоректального рака. В предпочтительных вариантах осуществления данного изобретения, рак представляет собой колоректальную аденокарциному.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для применения при лечении или профилактике рака толстой кишки. Ссылка [50] демонстрирует, что штаммы *Enterococcus* обладают сильным действием против рака толстой кишки, поэтому, согласно данным, приведенным в данной заявке, полипептиды флагеллина по изобретению могут быть особенно эффективными против рака толстой кишки. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для применения для уменьшения размера опухоли, уменьшения роста опухоли или уменьшения ангиогенеза при лечении рака толстой кишки. В предпочтительных вариантах осуществления данного изобретения, рак представляет собой аденокарциному толстой кишки.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для применения при лечении или профилактике рака прямой кишки. Ссылка [50] демонстрирует, что штаммы *Enterococcus* обладают сильным действием против рака прямой кишки, поэтому, согласно данным, приведенным в данной заявке, полипептиды флагеллина по изобретению могут быть особенно эффективными против рака прямой кишки. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для применения для уменьшения размера опухоли, уменьшения роста опухоли или уменьшения ангиогенеза при лечении рака прямой кишки. В предпочтительных вариантах осуществления данного изобретения, рак представляет собой аденокарциному прямой кишки. В предпочтительном варианте осуществления данного изобретения, изобретение обеспечивает композицию, содержащую полипептиды флагеллина из вида *Enterococcus gallinarum*, для применения при лечении рака прямой кишки.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для применения при лечении или профилактике рака желудка. Было показано, что карциномы желудка экспрессируют высокие уровни TLR5, и что лечение флагеллином вызывает сильную противоопухолевую активность []. Примеры демонстрируют, что полипептиды флагеллина по изобретению способны вызывать сильный ответ TLR5, поэтому полипептиды флагеллина по изобретению могут быть особенно эффективными против рака желудка. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для применения для уменьшения размера опухоли, уменьшения роста опухоли или уменьшения

ангиогенеза при лечении рака желудка. В предпочтительных вариантах осуществления данного изобретения, рак представляет собой аденокарциному желудка. В предпочтительных вариантах осуществления данного изобретения, изобретение относится к композиции, содержащей полипептиды флагеллина из вида *Enterococcus gallinarum*, для применения при лечении рака желудка.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для применения при лечении или профилактике меланомы. Флагеллин из *S. typhimurium* в сочетании с пептидом P10, ограниченным основным комплексом гистосовместимости класса II, снижает количество метастаз в легких на модели меланомы на мышах []. Примеры демонстрируют, что полипептиды флагеллина по изобретению способны вызывать более сильный ответ TLR5, чем *S. typhimurium*, поэтому полипептиды флагеллина по изобретению могут быть особенно эффективными против меланомы. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для применения для уменьшения размера опухоли, уменьшения роста опухоли или уменьшения ангиогенеза при лечении меланомы. В предпочтительном варианте осуществления данного изобретения, изобретение относится к композиции, содержащей полипептиды флагеллина из вида *Enterococcus gallinarum*, для применения при лечении меланомы.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для применения при лечении или профилактике нейробластомы. Известно, что активация TLR5 флагеллином *S. typhimurium* подавляет пролиферацию клеток и рост опухоли []. Примеры демонстрируют, что полипептиды флагеллина по изобретению способны вызывать более сильный ответ TLR5, чем *S. typhimurium*, поэтому полипептиды флагеллина по изобретению могут быть особенно эффективными против нейробластомы. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для применения для уменьшения размера опухоли, уменьшения роста опухоли или уменьшения ангиогенеза при лечении нейробластомы. В предпочтительном варианте осуществления данного изобретения, изобретение относится к композиции, содержащей полипептиды флагеллина из вида *Enterococcus gallinarum*, для применения при лечении нейробластомы.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, рак представляет собой рак кишечника. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, рак поражает часть тела, которая не является кишечником. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, рак не является раком кишечника. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, рак не является колоректальным раком. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, рак не является раком тонкого кишечника. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, лечение или профилактика происходит не в кишечнике, а в другом месте. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, лечение или профилактика происходит в кишечнике, а также на участке, отличном от кишечника.

Экспрессия TLR5 была обнаружена в линиях гематологических раковых клеток, включая множественную миелому [] и острый миелоидный лейкоз []. На примерах изобретатели продемонстрировали, что полипептиды флагеллина из рода *Enterococcus* особенно эффективны при активации сильного ответа TLR5. Следовательно, полипептиды флагеллина из рода *Enterococcus* могут быть полезны для лечения или профилактики гемобластозов, таких как множественная миелома и острый миелоидный лейкоз, которые экспрессируют TLR5. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления данного изобретения, изобретение относится к композициям, содержащим полипептиды флагеллина из рода *Enterococcus*, для применения при лечении или профилактике злокачественных гематологических заболеваний, таких как множественная миелома, острые и хронические лейкозы, такие как острый миелоидный лейкоз, острый лимфобластный лейкоз, острый миелогенный лейкоз, хронический лимфоцитарный лейкоз, хронический миелогенный лейкоз и острый моноцитарный лейкоз, лимфомы, такие как лимфомы Ходжкина и неходжкинские лимфомы, и миелодиспластические синдромы. В предпочтительном варианте осуществления данного изобретения, изобретение относится к композиции, содержащей полипептиды флагеллина из вида *Enterococcus gallinarum*, для применения при лечении острого миелоидного лейкоза.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, изобретение относится к композициям, содержащим полипептиды флагеллина из рода *Enterococcus* для применения при лечении или профилактике множественной миеломы. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, изобретение относится к композициям, содержащим полипептиды флагеллина из рода *Enterococcus* для применения при лечении или профилактике острого миелоидного лейкоза. В предпочтительном варианте осуществления данного изобретения, изобретение относится к композиции, содержащей полипептиды флагеллина из вида *Enterococcus gallinarum*, для применения при лечении множественной миеломы.

Различные агонисты TLR были протестированы на большом количестве моделей опухолей и в клинических испытаниях []. Например, было продемонстрировано, что агонист TLR5 CBLB502 способствует избавлению от опухоли на моделях Т- и В-клеточных лимфом мышей []. Системное введение агониста TLR5 энтолимода (фармакологически оптимизированного производного флагеллина) подавляло метастазирование клеток колоректального рака в печень на моделях мышей. Печень демонстрирует самый сильный ответ активации TLR5 после введения агониста TLR5 энтолимода []. На примерах изобретатели продемонстрировали, что полипептиды флагеллина из рода *Enterococcus* действуют как сильные агонисты TLR5. Следовательно, полипептиды флагеллина из рода *Enterococcus* могут быть особенно эффективными при лечении или профилактике Т- и В-клеточных лимфом, колоректального рака и рака печени. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для лечения или профилактики Т- и В-клеточных лимфом. В предпочтительном варианте осуществления данного изобретения, изобретение относится к композиции, содержащей

полипептиды флагеллина из вида *Enterococcus gallinarum*, для лечения Т- и В-клеточных лимфом.

В других вариантах осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению могут быть полезны для лечения или предотвращения метастазирования. В других вариантах осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению могут быть полезны при лечении метастатического рака. В других вариантах осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению могут быть полезны при лечении запущенного рака. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, изобретение относится к композициям, содержащим полипептиды флагеллина из рода *Enterococcus* для применения при лечении, уменьшении или предотвращении метастазирования. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению могут уменьшить или предотвратить рост метастазов. В предпочтительном варианте осуществления данного изобретения, изобретение относится к композиции, содержащей полипептиды флагеллина из вида *Enterococcus gallinarum*, для применения при лечении или профилактике метастазирования. В предпочтительном варианте осуществления данного изобретения, изобретение относится к композиции, содержащей полипептиды флагеллина из вида *Enterococcus gallinarum*, для применения при лечении или профилактике метастатического рака. В предпочтительном варианте осуществления данного изобретения, изобретение относится к композиции, содержащей полипептиды флагеллина из вида *Enterococcus gallinarum*, для применения при лечении или профилактике запущенного рака.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для применения при лечении или профилактике карциномы.

Флагеллин В (*FlaB*) *Vibrio vulnificus* эффективно подавляет рост опухоли за счет двухэтапной активации сигнальных путей TLR4 и TLR5. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, полипептиды флагеллина по данному изобретению могут активировать сигнальные пути TLR4 и TLR5. В других вариантах осуществления данного изобретения, полипептиды флагеллина по данному изобретению активируют только сигнальный путь TLR5.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, полипептиды флагеллина по данному изобретению могут активировать сигнальные пути NFκB. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, клетки-хозяева по изобретению могут активировать сигнальные пути TLR9. Ссылка [59] демонстрирует, что синергизм между флагеллином и агонистом TLR9, представляющим собой CpG-содержащие олигодезоксинуклеотиды, приводит к подавлению опухоли. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, клетки-хозяева по данному изобретению могут активировать сигнальные пути TLR5 и TLR9. В некоторых таких вариантах осуществления данного изобретения, композиция по данному изобретению содержит CpG-содержащие олигодезоксинуклеотиды или вводится в комбинации с CpG-содержащими

олигодезоксинуклеотидами.

Терапевтические эффекты композиций по данному изобретению при раке могут быть опосредованы провоспалительным механизмом. Активация TLR5 флагеллином запускает каскад провоспалительных сигналов. Ссылка [] демонстрирует, что взаимодействие флагеллина *S. typhimurium* с высокоиммуногенными опухолями вызывает ответ Th1 и подавление Treg, что приводит к ингибированию роста опухоли. Напротив, введение флагеллина не влияло на скорость роста слабоиммуногенных опухолей. Следовательно, в некоторых вариантах осуществления данного изобретения, полипептиды и композиции флагеллина по данному изобретению предназначены для применения при лечении иммуногенных опухолей, в частности высокоиммуногенных опухолей. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для стимуляции воспаления при лечении рака. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для стимуляции Th1 воспаления при лечении рака. Клетки Th1 продуцируют ИФН- γ и обладают сильным противораковым эффектом [60]. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для лечения рака на ранней стадии, такого как рак, не имеющий метастазов, или рак 0 стадии или 1 стадии. Развитие воспаления может быть более эффективным против рака на ранней стадии [60].

Ссылка [59] демонстрирует, что введение флагеллина после трансплантации опухоли значительно ингибировало рост антигенных опухолей. Различные эффекты флагеллина на рост опухоли коррелируют иммунным ответом, который был индуцирован. Введение флагеллина после трансплантации было связано с повышенным соотношением ИФН- γ :ИЛ-4 и снижением частоты CD4+CD25+ Т-регуляторных клеток. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления данного изобретения, полипептиды флагеллина и композиции по данному изобретению увеличивают соотношение ИФН- γ :ИЛ-4. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, полипептиды флагеллина и композиции по изобретению снижают частоту CD4+CD25+ Т-регуляторных клеток. В других вариантах осуществления данного изобретения, полипептиды флагеллина и композиции по данному изобретению не уменьшают соотношение ИФН- γ :ИЛ-4 и не увеличивают частоту CD4+CD25+ Т-клеток. Воспаление может иметь эффект подавления рака [], и провоспалительные цитокины, такие как TNF α , исследуются в качестве способов лечения рака []. Повышение регуляции генов, таких как TNF, может указывать на то, что композиции по данному изобретению могут быть полезны для лечения рака с помощью похожего механизма. Повышение регуляции лигандов CXCR3 (CXCL9, CXCL10) и ИФН- γ -индуцибельных генов (ИЛ-32), может указывать на то, что композиции по данному изобретению вызывают ответ ИФН- γ -типа. ИФН- γ представляет собой мощный фактор активации макрофагов, который может стимулировать активность уничтожения опухолей [], а CXCL9 и CXCL10, например, также обладают противораковым действием [].

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, композиции по

данному изобретению предназначены для стимуляции воспаления с целью усиления эффекта второго противоракового агента. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, лечение или профилактика рака включает повышение уровня экспрессии одного или более цитокинов. Например, в некоторых вариантах осуществления данного изобретения, лечение или профилактика рака включает повышение уровня экспрессии одного или более из ИЛ-1 β , ИЛ-6 и TNF- α , например, ИЛ-1 β и ИЛ-6, ИЛ-1 β и TNF- α , ИЛ-6 и TNF- α или всех трех из ИЛ-1 β , ИЛ-6 и TNF- α . Известно, что повышение уровней экспрессии любого из ИЛ-1 β , ИЛ-6 и TNF- α свидетельствует об эффективности лечения рака.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для применения при лечении пациента, который ранее получал химиотерапию. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для применения при лечении пациента, который не переносит химиотерапевтическое лечение. Композиции по данному изобретению могут быть особенно подходящими для таких пациентов.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, композиции по изобретению предназначены для применения при предотвращении рецидива. Композиции по изобретению может подходить для длительного введения. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, композиции по изобретению предназначены для применения при предотвращении прогрессирования рака.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для применения при лечении немелкоклеточной карциномы легкого. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для применения при лечении мелкоклеточной карциномы легкого. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для применения при лечении плоскоклеточной карциномы. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для применения при лечении аденокарциномы. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для применения при лечении железистых опухолей, карциноидных опухолей или недифференцированных карцином.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для применения при лечении гепатобластомы, холангиокарциномы, холангиоцеллюлярной цистаденокарциномы или рака печени, возникшего в результате вирусной инфекции.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для применения при лечении инвазивной протоковой карциномы, протоковой карциномы *in situ* или инвазивной дольковой карциномы.

В дополнительных вариантах осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для применения при лечении или профилактике

острого лимфобластного лейкоза (ALL - acute lymphoblastic leukemia), острого миелоидного лейкоза, аденокортикальной карциномы, базальноклеточной карциномы, рака желчных протоков, рака мочевого пузыря, опухоли костей, остеосаркомы/злокачественной фиброзной гистиоцитомы, глиомы ствола головного мозга, опухоли головного мозга, астроцитомы мозжечка, астроцитомы головного мозга/злокачественной глиомы, эпендимомы, медуллобластомы, супратенториальных примитивных нейроэктодермальных опухолей, рака молочной железы, бронхиальных аденом/карциноид, лимфомы Беркитта, карциноидной опухоли, рака шейки матки, хронического лимфоцитарного лейкоза, хронического миелолейкоза, хронических миелопролиферативных заболеваний, рака толстой кишки, кожной Т-клеточной лимфомы, рака эндометрия, эпендимомы, рака пищевода, саркомы Юинга, внутриглазной меланомы, ретинобластомы, рака желчного пузыря, рака желудка, карциноидной опухоли желудочно-кишечного тракта, стромальной опухоли желудочно-кишечного тракта (GIST), опухоли зародышевых клеток, глиомы зрительных путей у детей и гипоталамуса, лимфомы Ходжкина, меланомы, островково-клеточной карциномы, саркомы Капоши, почечно-клеточного рака, рака гортани, лейкозиев, лимфомы, мезотелиомы, нейробластомы, неходжкинской лимфомы, рака ротоглотки, остеосаркомы, рака яичников, рака поджелудочной железы, рака паращитовидной железы, рака глотки, аденомы гипофиза, неоплазии плазматических клеток, рака простаты, почечно-клеточной карциномы, ретинобластомы, саркомы, рака яичек, рака щитовидной железы или рака матки.

Композиции по данному изобретению могут быть особенно эффективными при использовании в комбинации с другими терапевтическими агентами. Иммуномодулирующие эффекты композиций по данному изобретению могут быть эффективными в сочетании с более прямыми противораковыми агентами. Следовательно, в некоторых вариантах осуществления данного изобретения, изобретение относится к композиции, содержащей полипептид флагеллина из рода *Enterococcus* (или кодирующий полинуклеотид, или экспрессирующую клетку-хозяин) и противораковый агент. В предпочтительных вариантах осуществления данного изобретения, противораковый агент представляет собой ингибитор иммунных контрольных точек, нацеленную терапию на основе антител, терапию на основе CAR-T-клеток, онколитический вирус или цитостатический лекарственный препарат. Предпочтительно противораковым агентом является Кейтруда (пембролизумаб, Merck). В дополнительных предпочтительных вариантах осуществления данного изобретения, композиция содержит противораковый агент, выбранный из группы, состоящей из: Ервой (ипилимумаб, BMS); Опдиво (ниволумаб, BMC); MEDI4736 (AZ/MedImmune); MPDL3280A (Roche/Genentech); Тремелимумаб (AZ/MedImmune); CT-011 (пидилизумаб, CureTech); BMS-986015 (лирилумаб, BMS); MEDI0680 (AZ/MedImmune); MSB-0010718C (Merck); PF-05082566 (Pfizer); MEDI6469 (AZ/MedImmune); BMS-986016 (BMS); BMS-663513 (упелумаб, BMS); IMP321 (Prima Biomed); LAG525 (Novartis); ARGX-110 (arGEN-X); PF-05082466 (Pfizer); CDX-1127 (варлилумаб; CellDex Therapeutics); TRX-518 (GITR Inc.); MK-4166 (Merck);

JTX-2011 (Jounce Therapeutics); ARGX-115 (arGEN-X); NLG-9189 (индоксимод, NewLink Genetics); INCB024360 (Incyte); IPH2201 (Врожденные иммунотерапевтические средства/AZ); NLG-919 (NewLink Genetics); анти-VISTA (JnJ); Эпакадостат (INCB24360, Incyte); F001287 (Flexus/BMS); CP 870893 (Пенсильванский университет); MGA271 (Macrogenix); Эмактузумаб (Roche/Genentech); Галунисертиб (Eli Lilly); Улокуплумаб (BMS); BKT140/BL8040 (Biokine Therapeutics); Бавитуксимаб (Peregrine Pharmaceuticals); CC 90002 (Celgene); 852A (Pfizer); VTX-2337 (VentiRx Pharmaceuticals); IMO-2055 (Hybridon, Idera Pharmaceuticals); LY2157299 (Eli Lilly); EW-7197 (Женский университет Ихва, Корея); Вемурафениб (Plexxikon); Дабрафениб (Genentech/GSK); BMS-777607 (BMS); BLZ945 (Мемориальный онкологический центр Слоуна-Кеттеринга); Унитуксин (динутуксимаб, United Therapeutics Corporation); Блинцито (блинатумомаб, Amgen); Цирамза (рамуцирумаб, Eli Lilly); Газива (обинутузумаб, Roche/Biogen); Кадсила (адо-трастузумаб эмтанзин, Roche/Genentech); Перьета (пертузумаб, Roche/Genentech); Адцетрис (брентуксимаб ведотин, Takeda/Millennium); Арзерпа (офатумумаб, GSK); Вектибикс (панитумумаб, Amgen); Авастин (бевацизумаб, Roche/Genentech); Эрбитукс (цетуксимаб, BMS/Merck); Бексар (тозитумомаб-I131, GSK); Зевалин (ибритумомаб тиуксетан, Biogen); Кампат (алемтузумаб, Bayer); Милотарг (гемтузумаб озогамицин, Pfizer); Герцептин (трастузумаб, Roche/Genentech); Ритуксан (ритуксимаб, Genentech/Biogen); волоциксимаб (Abbvie); Энаватузумаб (Abbvie); ABT-414 (Abbvie); Эллотузумаб (Abbvie/BMS); ALX-0141 (Ablynx); Озарализумаб (Ablynx); Актимаб-С (Actinium); Актимаб-Р (Actinium); Милатузумаб-докс (Actinium); Эмаб-SN-38 (Actinium); Наптумомаб эстафенатокс (Active Biotech); AFM13 (Affimed); AFM11 (Affimed); AGS-16C3F (Agensys); AGS-16M8F (Agensys); AGS-22ME (Agensys); AGS-15ME (Agensys); GS-67E (Agensys); ALXN6000 (самализумаб, Alexion); ALT-836 (Altor Bioscience); ALT-801 (Altor Bioscience); ALT-803 (Altor Bioscience); AMG780 (Amgen); AMG 228 (Amgen); AMG820 (Amgen); AMG172 (Amgen); AMG595 (Amgen); AMG110 (Amgen); AMG232 (адекатумумаб, Amgen); AMG211 (Amgen/MedImmune); BAY20-10112 (Amgen/Bayer); Рилотумумаб (Amgen); Деносумаб (Amgen); AMP-514 (Amgen); MEDI575 (AZ/MedImmune); MEDI3617 (AZ/MedImmune); MEDI6383 (AZ/MedImmune); MEDI551 (AZ/MedImmune); Моксетумомаб пасудотокс (AZ/MedImmune); MEDI565 (AZ/MedImmune); MEDI0639 (AZ/MedImmune); MEDI0680 (AZ/MedImmune); MEDI562 (AZ/MedImmune); AV-380 (AVEO); AV203 (AVEO); AV299 (AVEO); BAY79-4620 (Bayer); Анетумаб равтансин (Bayer); вантуктумаб (Bayer); BAY94-9343 (Bayer); Сибротузумаб (Boehringer Ingelheim); BI-836845 (Boehringer Ingelheim); B-701 (BioClin); BII015 (Biogen); Обинутузумаб (Biogen/Genentech); BI-505 (Bioinvent); BI-1206 (Bioinvent); TB-403 (Bioinvent); BT-062 (Biotest) BIL-010t (Biosceptre); MDX-1203 (BMS); MDX-1204 (BMS); Некитумумаб (BMS); CAN-4 (Cantargia AB); CDX-011 (Celldex); CDX1401 (Celldex); CDX301 (Celldex); U3-1565 (Daiichi Sankyo); Патритумаб (Daiichi Sankyo); тигатузумаб (Daiichi Sankyo); нимотузумаб (Daiichi Sankyo); DS-8895 (Daiichi Sankyo); DS-8873 (Daiichi Sankyo); DS-5573 (Daiichi Sankyo); MORab-004 (Eisai); MORab-009 (Eisai); MORab-003

(Eisai); MORab-066 (Eisai); LY3012207 (Eli Lilly); LY2875358 (Eli Lilly); LY2812176 (Eli Lilly); LY3012217 (Eli Lilly); LY2495655 (Eli Lilly); LY3012212 (Eli Lilly); LY3012211 (Eli Lilly); LY3009806 (Eli Lilly); циксутумумаб (Eli Lilly); Фланвотумаб (Eli Lilly); IMC-TR1 (Eli Lilly); Рамуцирумаб (Eli Lilly); Табалумаб (Eli Lilly); Занолимумаб (Emergent Biosolution); FG-3019 (FibroGen); FPA008 (Five Prime Therapeutics); FP-1039 (Five Prime Therapeutics); FPA144 (Five Prime Therapeutics); катумаксамаб (Fresenius Biotech); IMAB362 (Ganymed); IMAB027 (Ganymed); HuMax-CD74 (Genmab); HuMax-TFADC (Genmab); GS-5745 (Gilead); GS-6624 (Gilead); OMP-21M18 (демцизумаб, GSK); мапатумумаб (GSK); IMGN289 (ImmunoGen); IMGN901 (ImmunoGen); IMGN853 (ImmunoGen); IMGN529 (ImmunoGen); IMMU-130 (Immunomedics); милатузумаб-док (Immunomedics); IMMU-115 (Immunomedics); IMMU-132 (Immunomedics); IMMU-106 (Immunomedics); IMMU-102 (Immunomedics); Эпратузумаб (Immunomedics); Кливатузумаб (Immunomedics); IPH41 (Innate Immunotherapeutics); Даратумумаб (Janssen/Genmab); CNTO-95 (Intetumumab, Janssen); CNTO-328 (силтуксимаб, Janssen); KB004 (KaloBios); могамулизумаб (Kyowa Hakko Kirrin); KW-2871 (экроексимаб, Life Science); Сонепцизумаб (Lpath); Маргетуксимаб (Macrogenics); Эноблитузумаб (Macrogenics); MGD006 (Macrogenics); MGF007 (Macrogenics); МК-0646 (далотузумаб, Merck); МК-3475 (Merck); Sym004 (Symphogen/Merck Serono); DI17E6 (Merck Serono); MOR208 (Morphosys); MOR202 (Morphosys); Xma5574 (Morphosys); BPC-1C (энситуксимаб, Precision Biologics); TAS266 (Novartis); LFA102 (Novartis); BHQ880 (Novartis/Morphosys); QGE031 (Novartis); HCD122 (люкатумумаб, Novartis); LJM716 (Novartis); AT355 (Novartis); OMP-21M18 (Демцизумаб, OncoMed); OMP52M51 (Oncomed/GSK); OMP-59R5 (Oncomed/GSK); вантуктумаб (Oncomed/Bayer); СМС-544 (инотузумаб озогамицин, Pfizer); PF-03446962 (Pfizer); PF-04856884 (Pfizer); PSMA-ADC (Progenics); REGN1400 (Regeneron); REGN910 (несвакумаб, Regeneron/Sanofi); REGN421 (энотикумаб, Regeneron/Sanofi); RG7221, RG7356, RG7155, RG7444, RG7116, RG7458, RG7598, RG7599, RG7600, RG7636, RG7450, RG7593, RG7596, DCDS3410A, RG7414 (парсатузумаб), RG7160 (имгатузумаб), RG7159 (обинутузумаб), RG7686, RG3638 (онартузумаб), RG7597 (Roche/Genentech); SAR307746 (Sanofi); SAR566658 (Sanofi); SAR650984 (Sanofi); SAR153192 (Sanofi); SAR3419 (Sanofi); SAR256212 (Sanofi); SGN-LIV1A (линтузумаб, Seattle Genetics); SGN-CD33A (Seattle Genetics); SGN-75 (ворсетузумаб мафодотин, Seattle Genetics); SGN-19A (Seattle Genetics); SGN-CD70A (Seattle Genetics); SEA-CD40 (Seattle Genetics); ибритумомаб тиуксетан (Spectrum); MLN0264 (Takeda); ганитумаб (Takeda/Amgen); CEP-37250 (Teva); TB-403 (Thrombogenic); VB4-845 (Viventia); Xma2512 (Xencor); Xma5574 (Xencor); нимотузумаб (YM Biosciences); Карлумаб (Janssen); NY-ESO TCR (Adaptimmune); MAGE-A-10 TCR (Adaptimmune); CTL019 (Novartis); JCAR015 (Juno Therapeutics); KTE-C19 CAR (Kite Pharma); UCART19 (Cellestis); BPX-401 (Bellicum Pharmaceuticals); BPX-601 (Bellicum Pharmaceuticals); ATTCK20 (Unum Therapeutics); CAR-NKG2D (Celyad); Оникс-015 (Оных Pharmaceuticals); H101 (Shanghai Sunwaybio); DNX-2401 (DNATRIX); VCN-01 (VCN Biosciences); Colo-Ad1 (PsiOxus Therapeutics); ProstAtak (Advantagene); Онкос-102 (Oncos

Therapeutics); CG0070 (Cold Genesys); Pexa-vac (JX-594, Jennerex Biotherapeutics); GL-ONC1 (Genelux); T-VEC (Amgen); G207 (Medigene); HF10 (Takara Bio); SEPREHVIR (HSV1716, Virttu Biologics); OrienX010 (OrienGene Biotechnology); Пеолизин (Oncolytics Biotech); SVV-001 (Neotropix); Чачатак (CVA21, Viralytics); Алимта (Eli Lilly), цисплатин, оксалиплатин, иринотекан, фолиновая кислота, метотрексат, циклофосфамид, 5-фторурацил, Зикадия (Novartis), Тафинлар (GSK), Кскалкори (Pfizer), Иресса (AZ), Гилотриф (Boehringer Ingelheim), Тарцева (Astellas Pharma), Халавен (Eisai Pharma), Велипариб (Abbvie), AZD9291 (AZ), Алектиниб (Chugai), LDK378 (Novartis), Ганетеспиб (Synta Pharma), Тергенпуматуцел-L (NewLink Genetics), GV1001 (Kael-GemVax), Тивантиниб (ArQule); Цитоксан (BMS); Онковин (Eli Lilly); Адриамицин (Pfizer); Гемзар (Eli Lilly); Кселода (Roche); Иксемпра (BMS); Абраксан (Celgene); Трелстар (Debiopharm); Таксотер (Sanofi); Нексавар (Bayer); IMMU-132 (Immunomedics); E7449 (Eisai); Тремодокс (Celsion); Кометрик (Exellxis); Лонсур (Taiho Pharmaceuticals); Камптосар (Pfizer); UFT (Taiho Pharmaceuticals); и TS-1 (Taiho Pharmaceuticals).

В дополнительных предпочтительных вариантах осуществления данного изобретения, полипептиды флагеллина вводят в комбинации (одновременно или последовательно) с CpG-содержащими олигодезоксинуклеотидами, которые продемонстрировали полезные эффекты с другими флагеллинами [59].

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения полипептид флагеллина из рода *Enterococcus* является единственным терапевтически активным агентом(ами) в композиции по данному изобретению.

Защита от токсичных химических веществ, патогенов или радиационного воздействия

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, изобретение относится к полипептиду флагеллина из рода *Enterococcus*, предпочтительно к полипептиду флагеллина из вида *Enterococcus gallinarum*, предпочтительно к полипептиду флагеллина из штамма MRx0518, для применения в профилактике или лечении симптомов, связанных с воздействием токсического химического вещества, патогена или радиационного воздействия. Флагеллин по данному изобретению можно вводить субъектам, подверженным риску воздействия токсичных химических веществ, патогенов или радиации, или субъектам, недавно подвергавшимся воздействию токсичных химических веществ, патогенов или радиации, например, субъектам, подвергавшимся воздействию 1, 2, 3, 4 или 5 часов ранее.

Внезапное воздействие на человеческие популяции химических веществ, патогенов или радиации может привести к серьезной заболеваемости. Одна из стратегий защиты человеческих популяций состоит в том, чтобы активировать врожденные пути защиты хозяина, особенно те, которые быстро индуцируют экспрессию цитопротективных и/или антимикробных генов. Большая часть работы в этой области сосредоточена на агонисте TLR4 LPS/эндотоксине, однако введение LPS может привести к тяжелым воспалительным патологиям, включая сепсис или тяжелое повреждение легких. Кроме того, LPS является

слабым стимулятором эпителиальных клеток, которые являются первыми клетками, которые взаимодействуют с патогеном или химическим стимулом.

Флагеллин стимулирует защиту хозяина у различных организмов, включая млекопитающих, насекомых и растения. В отличие от LPS, флагеллин является мощным активатором сигнальных путей врожденного иммунитета в эпителиальных клетках, но, как правило является слабым активатором гемопоэтических клеток, таких как макрофаги и дендритные клетки. Было замечено, что флагеллин *S. typhimurium* не стимулирует значительных уровней «основных» провоспалительных цитокинов, таких как TNF- α , которые опосредуют побочные эффекты, связанные с LPS. Было замечено, что флагеллин *S. typhimurium* активирует TLR5-опосредованный врожденный иммунитет у мышей, защищая мышей от химического, патогенного или радиационного воздействия. [].

Было продемонстрировано, что введение флагеллина *S. typhimurium* защищает от радиационного воздействия через механизм, требующий TLR5 [66]. Оптимальная защита наблюдалась при профилактическом введении флагеллина за 2 часа до облучения, но значительная степень защиты все же наблюдалась, если флагеллин вводился в течение 4 ч после облучения. Примеры демонстрируют, что полипептиды флагеллина из рода *Enterococcus* способны стимулировать более сильный ответ TLR5, чем *S. typhimurium*. Таким образом, изобретатели продемонстрировали, что полипептиды флагеллина из рода *Enterococcus* и, в частности, вида *Enterococcus gallinarum* могут быть полезны в качестве радиозащитных агентов.

Изобретение относится к полипептидам флагеллина из рода *Enterococcus* для применения в качестве радиозащитных агентов. Изобретение также относится к полипептидам флагеллина из вида *Enterococcus gallinarum* для применения в качестве радиозащитных агентов. Более предпочтительно изобретение относится к полипептиду флагеллина из штамма MRx0518, в частности с последовательностью SEQ ID NO: 1, для применения в качестве радиозащитных агентов.

Также было показано, что лечение агонистом TLR5 энтолимодом снижает радиационно-индуцированное повреждение во всех трех основных типах радиочувствительных тканей: гематopoэтических, желудочно-кишечных и кожных. Также было продемонстрировано, что он смягчает радиационно-индуцированное повреждение эпителия на мышинной модели при облучении головы и шеи []. Примеры демонстрируют, что полипептиды флагеллина из рода *Enterococcus* действуют как мощный агонист TLR5. Таким образом, изобретатели продемонстрировали, что полипептиды флагеллина из рода *Enterococcus* и, в частности, вида *Enterococcus gallinarum* могут быть полезны для уменьшения радиационно-индуцированного повреждения. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, композиции, содержащие полипептиды флагеллина из рода *Enterococcus*, предназначены для применения для уменьшения радиационно-индуцированного повреждения в гематopoэтических, желудочно-кишечных тканях или тканях кожи. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, композиции, содержащие полипептиды флагеллина из рода *Enterococcus*, предназначены для

применения для уменьшения радиационно-индуцированного повреждения эпителия. В предпочтительном варианте осуществления данного изобретения, изобретение относится к композиции, содержащей полипептиды флагеллина из вида *Enterococcus gallinarum*, для применения для уменьшения радиационно-индуцированного повреждения.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, композицию по изобретению можно вводить, предпочтительно перорально, до радиотерапии. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, композицию по изобретению можно вводить, предпочтительно перорально, вскоре после радиотерапии. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению следует вводить пациенту, который недавно прошел радиотерапию или который должен пройти радиотерапию.

В предпочтительных вариантах осуществления данного изобретения, полипептиды флагеллина из рода *Enterococcus* вводят до получения дозы облучения. В других вариантах осуществления данного изобретения, полипептиды флагеллина из рода *Enterococcus* вводят после радиационного облучения, предпочтительно в течение 4 часов после облучения.

Лечение бактериальных инфекций

Было показано, что введение флагеллина *S. typhimurium* стимулирует иммунный ответ на бактериальную инфекцию. Ссылка [] демонстрирует, что профилактическое интраназальное введение флагеллина *S. typhimurium* с антибиотиком защищает мышей от респираторных бактерий *Streptococcus pneumoniae*, тогда как ссылка [66] демонстрирует, что пероральное введение флагеллина *S. typhimurium* за 2 часа до инфицирования *S. typhimurium* снижает смертность. Флагеллин индуцировал эти ответы, активируя врожденный иммунный ответ TLR5. Примеры демонстрируют, что полипептиды флагеллина из рода *Enterococcus* способны стимулировать более сильный ответ TLR5, чем *S. typhimurium*. Таким образом, изобретатели продемонстрировали, что полипептиды флагеллина из рода *Enterococcus* и, в частности, вид *Enterococcus gallinarum* может быть полезен для лечения или профилактики бактериальных инфекций.

Изобретение относится к полипептиду флагеллина из рода *Enterococcus* для применения при лечении или профилактике бактериальных инфекций. Изобретение также относится к полипептиду флагеллина вида *Enterococcus* для применения при лечении или профилактике бактериальных инфекций. Более предпочтительно изобретение относится к полипептиду флагеллина из штамма MRx0518, в частности с последовательностью SEQ ID NO: 1, для применения при лечении или профилактике бактериальных инфекций.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, полипептиды флагеллина из рода *Enterococcus* используются в комбинации с антибиотиком для применения при лечении бактериальных инфекций. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, полипептиды флагеллина из рода *Enterococcus* используются в качестве единственного терапевтического агента в композиции для применения при лечении бактериальных инфекций.

Адъюванты вакцины

Микробные компоненты можно использовать в качестве адъювантов для усиления иммунных ответов на слабоиммуногенные вакцины. Было показано, что флагеллин действует как адъювант в вакцинах от бактериальных, вирусных и паразитарных инфекций, однако в большинстве этих исследований использовался флагеллин из *S. typhimurium* и *Vibrio vulnificus* [15]. Эффективность полипептидов флагеллина других видов для действия в качестве адъювантов вакцины, в частности *Enterococcus spp.*, неизвестна.

Флагеллин действует как адъювант, стимулируя врожденный иммунный ответ через рецептор TLR5. Изобретатели неожиданно продемонстрировали, что полипептиды флагеллина из рода *Enterococcus* способны стимулировать более сильный ответ TLR5, чем *S. typhimurium*. Таким образом, изобретатели продемонстрировали, что полипептиды флагеллина из рода *Enterococcus* и, в частности, вид *Enterococcus gallinarum* может быть полезен в качестве адъювантов вакцины. Применение полипептида флагеллина в качестве адъюванта вакцины означает, что полипептид флагеллина применяется, например, для обеспечения защиты от инфекционного агента или предотвращения инфицирования инфекционным агентом, обычно путем усиления иммунного ответа на отдельный антиген.

Изобретение относится к полипептидам флагеллина из рода *Enterococcus* для применения в качестве адъювантов вакцины. Изобретение также относится к полипептидам флагеллина из вида *Enterococcus gallinarum* для применения в качестве адъювантов вакцины. Более предпочтительно изобретение относится к полипептиду флагеллина из штамма MRx0518, в частности с последовательностью SEQ ID NO: 1, для применения в качестве адъювантов вакцины.

Изобретение также относится к вакцинным композициям, содержащим полипептиды флагеллина по изобретению в качестве адъюванта. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, вакцинные композиции для применения при лечении предназначены для лечения или профилактики бактериальных инфекций. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, бактериальный патоген, подлежащий лечению или профилактике, представляет собой *Y. pestis*, столбняк, *Streptococcus pneumoniae*, *Escherichia coli* или *M. tuberculosis*. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, вакцинные композиции для применения при лечении предназначены для лечения или профилактики вирусных инфекций. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, вирусный патоген, который необходимо лечить или предупреждать, представляет собой вирус гриппа, ВИЧ, бешенства или ящура. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, вакцинные композиции для применения при лечении предназначены для лечения или профилактики паразитарных инфекций. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, паразит представляет собой *Plasmodium vivax*, *Plasmodium yoelii* или *Eimeria tenella*. В любых таких вариантах осуществления данного изобретения, композиция содержит по меньшей мере один антиген из соответствующего патогена. В таких предпочтительных вариантах осуществления данного изобретения, композиция содержит флагеллин по данному изобретению, слитый или конъюгированный по меньшей мере с одним антигеном из соответствующего патогена.

В таких вариантах осуществления данного изобретения, изобретение относится к слитому полипептиду, содержащему флагеллин по изобретению, необязательный линкер и антиген из патогена или паразита.

Введение через слизистую оболочку является привлекательным путем введения вакцины. Флагеллин является мощным активатором сигнальных путей врожденного иммунитета в эпителиальных клетках, которые являются первым основным типом клеток, которые сталкиваются с агентами, вводимыми через слизистую оболочку. Было показано, что белки флагеллины *S. typhimurium* и *Vibrio vulnificus* обладают сильной адьювантной активностью в вакцинах для слизистых оболочек против гриппа, вируса Западного Нила, *Escherichia coli*, *Yersinia pestis*, *Clostridium tetani*, *C. jejuni*, *Streptococcus spp.* и *Plasmodium falciparum* [15]. Эффективность полипептидов флагеллина других видов действовать в качестве адьювантов вакцин для слизистых оболочек неизвестна.

Флагеллин действует как адьювант, стимулируя врожденный иммунный ответ через рецептор TLR5. Изобретатели неожиданно продемонстрировали, что полипептиды флагеллина из рода *Enterococcus* способны стимулировать более сильный ответ TLR5, чем *S. typhimurium*. Таким образом, изобретение относится к полипептидам флагеллина из рода *Enterococcus* для применения в качестве адьювантов вакцины для слизистых оболочек. В предпочтительных вариантах осуществления данного изобретения, изобретение относится к полипептидам флагеллина из вида *Enterococcus gallinarum* для применения в качестве адьювантов вакцины для слизистых оболочек. Более предпочтительно изобретение относится к полипептиду флагеллина из штамма MRx0518, в частности с последовательностью SEQ ID NO: 1, для применения в качестве адьювантов вакцины для слизистых оболочек.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, полипептиды флагеллина из рода *Enterococcus* предназначены для применения в вакцине для слизистых оболочек для лечения или профилактики бактериальных инфекций. В предпочтительных вариантах осуществления данного изобретения, бактериальная инфекция представляет собой *Escherichia coli*, *Yersinia pestis*, *Clostridium tetani*, *C. jejuni*, *Streptococcus spp.* или *Plasmodium falciparum*. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, полипептиды флагеллина из рода *Enterococcus* предназначены для применения в вакцинах для слизистых оболочек для лечения или профилактики вирусных инфекций. В предпочтительных вариантах осуществления данного изобретения, вирусная инфекция представляет собой вирус гриппа или вирус Западного Нила.

Введение композиций по данному изобретению может приводить к увеличению экспрессии фактора некроза опухоли альфа (TNF- α). Известно, что TNF- α важен для ответа на вакцины. Например, было показано, что TNF- α необходим для эффективного ответа на вакцину при вакцинации против гриппа пожилого населения []. Поскольку введение композиций по данному изобретению может увеличивать экспрессию TNF- α , композиции по данному изобретению могут быть полезны в качестве адьюванта вакцины. В одном варианте осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению

предназначены для применения в качестве адъюванта вакцины за счет увеличения уровня и/или активности TNF- α . В одном варианте осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для применения в качестве адъюванта вакцины. В одном варианте осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для применения в качестве адъюванта вакцины при терапии гриппа. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для усиления иммунного ответа против антигена. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, изобретение относится к композиции для введения в комбинации с антигеном. В таких вариантах осуществления данного изобретения, флагеллин по данному изобретению может быть слит или конъюгирован с антигеном. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для введения пациенту незадолго до или после вакцинации.

Enterococcus gallinarum и, в частности, штамм MRX518 имеют жгутики, и флагеллины могут быть агонистами TLR5. Агонисты TLR разрабатываются в качестве адъювантов вакцин для различных типов антигенов, особенно у пожилого населения []. Также MRX518 представляет собой агонист TLR5. Следовательно, композиции по данному изобретению могут быть полезны в качестве адъювантов вакцины, в частности, для вакцины, вводимой пожилым пациентам (например, возрастом старше 40, 50, 60, 70 или 80 лет), у которых может быть снижена активность иммунной системы. Передача сигналов TLR5 также играет ключевую роль в ассоциированных с возрастным ответом врожденного иммунитета []. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, композиции предназначены для усиления врожденного иммунного ответа. Хотя агонисты TLR5 разрабатываются в качестве адъювантов вакцин, все они получены из известных патогенов и/или являются синтетическими. Напротив, композиции по данному изобретению содержат комменсальные бактерии.

Введение композиций по данному изобретению может приводить к увеличению экспрессии ИЛ-6. Повышенная экспрессия ИЛ-6 была связана с ответом на вакцины при многих заболеваниях. Например, ИЛ-6 продуцировался воспалительными моноцитами CD14+CD16- после того, как взрослым вводили вакцину против гриппа [], и более высокие уровни ИЛ-6 были связаны с достижением ответа на вакцину против гриппа []. Кроме того, ИЛ-6 продуцировался после инъекции адъювантной системы AS03 [], и было продемонстрировано, что снижение регуляции ИЛ-6 у мышей снижает ответ Т-хелперных клеток после введения противотуберкулезной вакцины []. После введения композиций по данному изобретению может увеличиваться экспрессия ИЛ-6, композиции по изобретению могут быть полезны в качестве адъюванта вакцины. В одном варианте осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для применения в качестве адъюванта вакцины за счет увеличения уровня и/или активности ИЛ-6. В одном варианте осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для применения в качестве адъюванта вакцины. В одном

варианте осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для применения в качестве адъюванта вакцины при терапии туберкулеза.

Кроме того, было продемонстрировано, что экспрессия ИЛ-6 и TNF- α коррелирует с эффективностью терапевтической вакцины против ВИЧ [Huang et al], вакцины против туберкулеза и вакцины против хламидиоза []. Su et al. [] показали, что совместная инокуляция ИЛ-6 или TNF- α с FMDV ДНК-вакциной приводила к увеличению экспрессии ИФН- γ CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетками, более высокой экспрессии ИЛ-4 в CD4⁺ Т-клетках и более высокому антиген-специфическому цитотоксическому ответу. Поскольку введение композиций по данному изобретению может увеличивать экспрессию ИЛ-6 и TNF- α , композиции по данному изобретению могут быть полезны в качестве адъюванта вакцины. В одном варианте осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению могут быть полезны для применения в качестве адъюванта вакцины за счет увеличения уровня и/или активности TNF- α . В одном варианте осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению могут быть полезны для применения в качестве адъюванта вакцины за счет увеличения уровня и/или активности ИЛ-6. В конкретном варианте осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению могут быть полезны для применения в качестве адъюванта вакцины за счет увеличения уровня и/или активности TNF- α и ИЛ-6. В одном варианте осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для применения в качестве адъюванта вакцины при терапии ВИЧ. В одном варианте осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для применения в качестве адъюванта вакцины при терапии хламидиоза.

Введение композиций по данному изобретению может приводить к увеличению экспрессии ИЛ-1 β . Li et al. [] показали, что адъювант гидроксид алюминия активизирует секрецию ИЛ-1 β , и предположили, что сам ИЛ-1 β может действовать как адъювант. Поскольку введение композиций по данному изобретению может увеличивать экспрессию ИЛ-1 β , композиции по данному изобретению могут быть полезны в качестве адъюванта вакцины. Примеры демонстрируют, что введение композиций по изобретению может увеличить соотношение CD8⁺ Т-клеток к Treg. Было продемонстрировано, что адъюванты стимулируют CD8⁺ Т-клетки [], и, поскольку было показано, что введение композиций по данному изобретению увеличивает отношение CD8⁺Т-клеток к Treg, композиции по данному изобретению могут быть полезны в качестве адъюванта вакцины. В одном варианте осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для применения в качестве адъюванта вакцины. В одном варианте осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для применения в качестве адъюванта вакцины путем увеличения соотношения CD8⁺ Т-клеток к Treg.

Введение композиций по данному изобретению может приводить к увеличению экспрессии или уровней лигандов CXCR3 CXCL9 и CXCL10. Все известные адъюванты, такие как ASO3, CpG, GLA-SE, α GalCer, увеличивают CXCL9 и 10 [], что предполагает,

что композиции по данному изобретению будут эффективны в качестве адъювантов. Кроме того, CXCL9 и 10 ассоциированы с ИФН γ /Th1 ответами и способствуют выработке антител []. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для применения при стимулировании выработки антител против антигена, в частности, патогенного или ракового антигена. Также, CXCL9 является более чувствительным показателем, чем ИФН- γ , для индуцированных вакциной Т-клеточных ответов у добровольцев, получавших исследованные вакцины против малярии []. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для применения при стимулировании Т-клеточного ответа против антигена, в частности, патогенного или ракового антигена. В одном варианте осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для применения в качестве адъюванта вакцины за счет увеличения уровня и/или активности CXCL9 и CXCL10. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, композиции предназначены для защиты от малярии.

Введение композиций по данному изобретению может приводить к увеличению экспрессии или уровней ИЛ-12p70. Этот эффект был связан с эффективностью адъюванта вакцины, и ИЛ-12 был предложен в качестве самого адъюванта [], что предполагает, что композиции по данному изобретению будут эффективны в качестве адъювантов. В одном варианте осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для применения в качестве адъюванта вакцины путем увеличения уровня и/или активности ИЛ-12p70.

Как правило, при применении в качестве адъюванта вакцины композиции по данному изобретению вводят сами по себе, чтобы обеспечить адъювантный эффект для антигена, который вводился пациенту отдельно. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, композицию по данному изобретению вводят перорально, тогда как антиген вводят парентерально. В альтернативных вариантах осуществления данного изобретения, флагеллин по данному изобретению может быть слит или конъюгирован с антигеном.

Композиции по данному изобретению можно использовать для усиления иммунного ответа на любой полезный антиген. Примеры антигенов для применения в изобретении включают: вирусные антигены, такие как вирусные поверхностные белки; бактериальные антигены, такие как белковые и/или сахаридные антигены; грибковые антигены; паразитарные антигены; и опухолевые антигены. Изобретение особенно полезно для вакцин против вируса гриппа, ВИЧ, анкилостомоза, вируса гепатита В, вируса простого герпеса, бешенства, респираторно-синцитиального вируса, цитомегаловируса, *Staphylococcus aureus*, хламидиоза, коронавируса SARS, вируса ветряной оспы, *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Bacillus anthracis*, вируса Эпштейна-Барра, вируса папилломы человека и т.д. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, флагеллин по данному изобретению слит или конъюгирован с одним или более из этих антигенов.

Дополнительные антигены для применения с флагеллинами по изобретению включают гликопротеиновые и липогликановые антигены. В определенных вариантах осуществления данного изобретения, антиген представляет собой антиген архей. Примеры ассоциированных с опухолью антигенов включают антиген меланомы E (MAGE), карциноэмбриональный антиген (CEA), MUC-1, HER2, сиалил-Tn (STn), обратную транскриптазу теломеразы человека (hTERT), ген опухоли Вильмса (WT1), CA-125, простатоспецифический антиген (PSA - prostate-specific antigen), антигены вируса Эпштейна-Барра, неоантигены и онкопротеины.

Флагеллины по данному изобретению также могут быть полезны для усиления ответа на вакцины против неинфекционных заболеваний, таких как болезнь Альцгеймера и другие нейродегенеративные расстройства, и в этом случае антигеном для применения с изобретением может быть амилоид-бета или Тау. Другие такие антигены неинфекционных заболеваний включают PCSK9 (для лечения повышенного холестерина). Флагеллины по данному изобретению также могут быть полезны для усиления ответа на вакцины против веществ, вызывающих привыкание, например, никотина, алкоголя или опиатов.

Изобретение также относится к применению: (i) водного препарата антигена; и (ii) композиции, содержащей полипептид флагеллина из вида *Enterococcus gallinarum*, при производстве лекарственного средства для повышения иммунного ответа у пациента.

Иммунный ответ, вызываемый этими способами и применениями, обычно будет включать выработку антител, предпочтительно выработку защитных антител.

Стимулирование иммунной системы

Композиции по данному изобретению могут приводить к иммунной стимуляции. Поскольку введение композиций по данному изобретению может иметь иммуностимулирующий эффект, композиции по данному изобретению могут быть полезны при лечении заболеваний, в частности заболеваний, характеризующихся пониженной активацией иммунной системы, и заболеваний, которые излечиваются с помощью повышенного иммунного ответа. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для применения для стимуляции иммунной системы. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для применения для лечения заболеваний путем стимуляции иммунной системы. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для применения для стимуляции иммунной системы.

Композиции по данному изобретению могут быть полезны при лечении заболеваний, характеризующихся увеличением процентного содержания Treg в популяции клеток. В одном варианте осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению могут быть полезны для применения для лечения или профилактики заболеваний, характеризующихся увеличением процентного содержания Treg в популяции клеток. В одном варианте осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению могут быть полезны для применения для лечения или профилактики

заболеваний, характеризующихся увеличением процентного содержания CD4+CD25+CD127- клеток в популяции клеток. В одном варианте осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для применения при лечении или профилактике заболеваний за счет уменьшения процентного содержания Treg в популяциях клеток. В одном варианте осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для применения для снижения подавления иммунного ответа с помощью Treg. В одном варианте осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для применения для стимуляции иммунного ответа путем селективного снижения Treg. В одном варианте осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для применения при иммуностимуляции, при этом композиции по изобретению снижают количество или процентное содержание Treg.

Композиции по данному изобретению могут быть полезны при лечении заболеваний, характеризующихся снижением соотношения CD8/Treg и/или активированных CD8/Treg клеток. В одном варианте осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для лечения или профилактики заболеваний, характеризующихся снижением соотношения CD8/Treg клеток. В одном варианте осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для лечения или профилактики заболеваний, характеризующихся снижением соотношения активированных CD8/Treg клеток. В одном варианте осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для применения для стимуляции иммунного ответа путем увеличения соотношения CD8/Treg клеток. В одном варианте осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для применения для стимуляции иммунного ответа путем увеличения соотношения активированных CD8/Treg клеток.

Композиции по данному изобретению могут быть полезны при лечении заболеваний, характеризующихся уменьшением количества или процентного содержания В-клеток. В одном варианте осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для применения при лечении или профилактике заболеваний, характеризующихся уменьшением количества или процентного содержания В-клеток. В одном варианте осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для применения при лечении или профилактике заболеваний, характеризующихся уменьшением количества или процентного содержания CD19+CD3-клеток. В одном варианте осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для применения при лечении или профилактике заболеваний путем увеличения количества или процентного содержания В-клеток в популяциях клеток, при этом увеличение количества или процентного содержания В-клеток приводит к иммунной стимуляции. В одном варианте осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для применения для стимуляции иммунного ответа путем увеличения количества или процентного содержания В-клеток.

Композиции по данному изобретению могут быть полезны при лечении заболеваний, характеризующихся уменьшением количества или процентного содержания CD8 цитотоксических Т-клеток. В одном варианте осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для применения при лечении или профилактике заболеваний, характеризующихся уменьшением количества или процентного содержания CD8 цитотоксических Т-клеток. В одном варианте осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для применения при лечении или профилактике заболеваний путем увеличения количества или процентного содержания CD8 цитотоксических Т-клеток в популяциях клеток, при этом увеличение количества или процентного содержания CD8 цитотоксических Т-клеток приводит к иммунной стимуляции. В одном варианте осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для применения для стимуляции иммунного ответа путем увеличения количества или процентного содержания CD8 цитотоксических Т-клеток.

Композиции по данному изобретению могут быть полезны при лечении заболеваний, характеризующихся уменьшением количества или процентного содержания CD8⁺ активированных клеток. В одном варианте осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для применения при лечении или профилактике заболеваний, характеризующихся уменьшением количества или процентного содержания CD8⁺ активированных клеток. В одном варианте осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для применения при лечении или профилактике заболеваний путем увеличения количества или процентного содержания CD8⁺ активированных клеток в популяциях клеток, при этом увеличение количества или процентного содержания CD8⁺ активированных клеток приводит к иммунной стимуляции. В одном варианте осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для применения для стимуляции иммунного ответа путем увеличения количества или процентного содержания CD8⁺ активированных клеток.

Введение композиций по данному изобретению может приводить к увеличению экспрессии провоспалительных молекул, таких как провоспалительные цитокины. Примеры провоспалительных молекул, которые могут показывать увеличение уровней экспрессии при введении композиций по данному изобретению, включают ИЛ-8, ИЛ-12p70, ИЛ-23, TNF- α , ИЛ-1 β и ИЛ-6. Поскольку введение композиций по данному изобретению может увеличивать экспрессию провоспалительных молекул, композиции по данному изобретению могут быть полезны при лечении заболеваний, характеризующихся снижением экспрессии провоспалительных молекул, таких как провоспалительные цитокины. В одном варианте осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для лечения или профилактики заболеваний, характеризующихся снижением экспрессии и/или активности провоспалительных молекул, в частности заболеваний, характеризующихся снижением экспрессии и/или активности

провоспалительных цитокинов. В определенном варианте осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для применения при лечении или профилактике заболеваний, характеризующихся снижением экспрессии и/или активности ИЛ-8, ИЛ-12p70, ИЛ-23, TNF- α , ИЛ-1 β , и/или ИЛ-6. В одном варианте осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для применения при лечении или профилактике заболеваний путем увеличения экспрессии и/или активности ИЛ-23, TNF- α , ИЛ-1 β и/или ИЛ-6. В одном варианте осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для применения в стимулировании иммунного ответа путем увеличения экспрессии и/или активности ИЛ-8, ИЛ-12p70, ИЛ-23, TNF- α , ИЛ-1 β и/или ИЛ-6.

Введение композиций по данному изобретению может приводить к увеличению экспрессии ИЛ-1 β . ИЛ-1 β представляет собой провоспалительный цитокин [1]. Производство и секреция ИЛ-1 β регулируется инфламмасомой, белковым комплексом, который связан с активацией воспалительной реакции [2]. Поскольку введение композиций по данному изобретению может увеличивать экспрессию ИЛ-1 β , композиции по данному изобретению могут быть полезны при лечении заболеваний, характеризующихся снижением экспрессии ИЛ-1 β . В определенном варианте осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для применения при лечении или профилактике заболеваний, характеризующихся снижением экспрессии и/или активности ИЛ-1 β . В одном варианте осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для применения при лечении или профилактике заболеваний путем увеличения экспрессии и/или активности ИЛ-1 β .

Введение композиций по данному изобретению может приводить к увеличению экспрессии ИЛ-23. ИЛ-23 был связан с воспалением [3]. Предполагаемые функции ИЛ-23 в иммунном ответе включают стимулирование пролиферации CD4⁺ Т-клеток памяти и стимуляцию секреции ИФН- γ дендритными клетками (ДК) [4]. Поскольку введение композиций по данному изобретению может увеличивать экспрессию ИЛ-23, композиции по данному изобретению могут быть полезны при лечении заболеваний, характеризующихся снижением экспрессии ИЛ-23. В определенном варианте осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для применения при лечении или профилактике заболеваний, характеризующихся снижением экспрессии и/или активности ИЛ-23. В конкретном варианте осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для применения при лечении или профилактике заболеваний путем увеличения экспрессии и/или активности ИЛ-23. В одном варианте осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для стимулирования иммунного ответа путем увеличения экспрессии и/или активности ИЛ-23.

Введение композиций по данному изобретению может приводить к увеличению экспрессии фактора некроза опухоли альфа (TNF- α). TNF- α представляет собой провоспалительный цитокин, который, как известно, участвует в различных сигнальных

путях, способствующих гибели клеток. TNF- α инициирует апоптоз путем связывания со своим когнатным рецептором TNFR-1, что приводит к каскаду событий расщепления в апоптотическом пути []. TNF- α может также вызывать некроз через RIP киназа-зависимый механизм []. Поскольку введение композиций по данному изобретению может увеличивать экспрессию TNF- α , композиции по данному изобретению могут быть полезны при лечении заболеваний, в частности, для применения при лечении или профилактике заболеваний, характеризующихся снижением экспрессии TNF- α . В одном варианте осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для применения при лечении заболеваний, характеризующихся снижением экспрессии TNF- α . В определенном варианте осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для применения при лечении или профилактике заболеваний, характеризующихся снижением экспрессии и/или активности TNF- α . В одном варианте осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению могут быть полезны для лечения или профилактики заболеваний путем увеличения экспрессии и/или активности TNF- α . В одном варианте осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для стимулирования иммунного ответа путем увеличения экспрессии и/или активности TNF- α .

Введение композиций по данному изобретению может приводить к увеличению экспрессии ИЛ-6. ИЛ-6, провоспалительный цитокин, который вырабатывается во время воспаления и способствует дифференцировке наивных CD4⁺ Т-клеток и дифференцировке CD8⁺ Т-клеток в цитотоксические Т-клетки []. Поскольку введение композиций по данному изобретению может увеличивать экспрессию ИЛ-6, композиции по данному изобретению могут быть полезны при лечении заболеваний, характеризующихся снижением экспрессии ИЛ-6. В определенном варианте осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для применения при лечении или профилактике заболеваний, характеризующихся снижением экспрессии и/или активности ИЛ-6. В одном варианте осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для применения при лечении или профилактике заболеваний путем увеличения экспрессии и/или активности ИЛ-6. В одном варианте осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для стимулирования иммунного ответа путем увеличения экспрессии и/или активности ИЛ-6.

Bettelli et al. [] сообщили, что ИЛ-6 подавляет продукцию Treg. Композиции по данному изобретению могут увеличивать экспрессию ИЛ-6, поэтому композиции по данному изобретению могут избирательно уменьшать количество или процентное содержание Treg за счет увеличения экспрессии ИЛ-6. В одном варианте осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для иммуностимуляции путем увеличения экспрессии и/или активности ИЛ-6. В другом варианте осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для иммуностимуляции путем уменьшения количества или процентного содержания Treg.

Примеры также демонстрируют, что композиции по данному изобретению способствуют дифференцировке Т-хелперных клеток и цитотоксических Т-лимфоцитов. Следовательно, в некоторых вариантах осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для применения для стимуляции дифференцировки Т-хелперных клеток и/или цитотоксических Т-лимфоцитов.

Клеточная терапия

Терапия Т-клетками с химерным антигенным рецептором (CAR-T)

Введение композиций по данному изобретению может приводить к увеличению экспрессии ИЛ-6. Повышенная экспрессия ИЛ-6 коррелировала с ответом на терапию CD19 CAR-T хронического лимфоцитарного лейкоза. Увеличение сывороточного ИЛ-6 было связано с размножением CAR-T-клеток, тогда как ингибирование ИЛ-6 было связано с ингибированием пролиферации CAR-T-клеток []. Поскольку введение композиций по данному изобретению может увеличивать экспрессию ИЛ-6, композиции по данному изобретению могут быть полезны в клеточной терапии, в частности в терапии CAR-T-клетками. В одном варианте осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для применения в клеточной терапии. В одном варианте осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для применения в терапии CAR-T-клетками. В одном варианте осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для применения при лечении хронического лимфолейкоза.

Было показано, что селективное истощение Treg повышает эффективность цитотоксических лимфоцитов []. CAR-T-клетки являются подмножеством цитотоксических лимфоцитов, и поэтому считается, что избирательное истощение Treg является эффективным при терапии CAR-T-клетками. Поскольку введение композиций по данному изобретению может истощать Treg, композиции по данному изобретению могут быть полезны в клеточной терапии, в частности в терапии CAR-T-клетками.

Следовательно, композиции по данному изобретению могут быть полезны в клеточной терапии, в частности, для усиления ответа на клеточную терапию.

Терапия мезенхимальными стволовыми клетками (MSC - mesenchymal stem cell)

Сообщалось, что терапия мезенхимальными стволовыми клетками (MSC) обладает иммуностимулирующими свойствами. Когда MSC обрабатывают LPS, они активируют провоспалительные цитокины ИЛ-6 и ИЛ-8, что вызывает повышенную пролиферацию В-клеток []. Следовательно, поскольку композиции по данному изобретению могут увеличивать экспрессию ИЛ-6, они могут быть полезны в сочетании с терапией MSC клетками.

Терапия трансплантацией стволовых клеток

Сообщалось, что вместо применения недифференцированных стволовых клеток в терапии трансплантацией стволовых клеток, может быть полезным дифференцировать стволовые клетки до некоторой степени перед их трансплантацией. Например, Heng et al. [] сообщили, что кардиомиогенная дифференцировка стволовых клеток может быть полезной

благодаря более высокой эффективности приживления, усиленной регенерации миоцитов и улучшенному восстановлению сердечной функции. Поскольку введение композиций по данному изобретению может инициировать дифференцировку нейронов в недифференцированных клетках нейробластомы, композиции по данному изобретению могут быть полезны для дифференцировки стволовых клеток в терапии трансплантацией стволовых клеток.

Трансплантация гемопоэтических стволовых клеток

Трансплантация гемопоэтических стволовых клеток - это трансплантация мультипотентных гемопоэтических стволовых клеток, обычно полученных из костного мозга, периферической крови или пуповинной крови. Было показано, что колонизация кишечника *Enterococci* (*Enterococcus gallinarum* и *Enterococcus casseliflavus*) перед аллогенной трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток приводит к значительному увеличению 2-летней выживаемости пациентов после этого из-за снижения безрецидивной смертности[]. Следовательно, иммуномодулирующий эффект, продемонстрированный в примерах, может быть полезен в терапии трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению могут быть полезны для улучшения выживаемости после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток и, в частности, после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток.

Композиции по данному изобретению могут быть полезны в комбинации с аллогенной трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток. Композиции по данному изобретению могут быть эффективными для усиления успешного ответа пациента на аллогенную трансплантацию гемопоэтических стволовых клеток. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению вводят до трансплантации гемопоэтических стволовых клеток. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для введения пациенту, которому запланирована трансплантация гемопоэтических стволовых клеток. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению вводят после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для введения пациенту, перенесшему трансплантацию гемопоэтических стволовых клеток.

«Старение» иммунной системы

Fulop *et al.* [] определили, что увеличение количества Тreg-клеток и уменьшение количества В-клеток связано со старением в адаптивной иммунной системе. Следовательно, композиции по данному изобретению можно использовать для предотвращения или задержки старения иммунной системы. В одном варианте осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для применения предотвращения старения иммунной системы. В другом варианте осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены

для замедления старения иммунной системы, характеризующегося увеличением количества Трег-клеток. В другом варианте осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для замедления старения иммунной системы, характеризующегося уменьшением количества В-клеток. В другом варианте осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для замедления старения иммунной системы, характеризующегося увеличением количества Трег-клеток и уменьшением количества В-клеток. В одном варианте осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для замедления старения иммунной системы за счет уменьшения количества Трег-клеток. В одном варианте осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для замедления старения иммунной системы за счет увеличения количества В-клеток. В другом варианте осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для замедления старения иммунной системы за счет уменьшения количества Трег-клеток и увеличения количества В-клеток. В одном варианте осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для применения при лечении заболеваний, вызванных старением иммунной системы. В одном варианте осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для применения при лечении заболеваний, связанных со старением, путем задержки и/или предотвращения старения иммунной системы.

Кроме того, было высказано предположение, что адъюванты вакцины могут преодолевать старение иммунной системы []. Поскольку композиции по данному изобретению подходят для применения в качестве адъюванта вакцины, композиции по данному изобретению могут быть полезны для предотвращения или задержки старения иммунной системы. В другом варианте осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для применения в качестве адъюванта вакцины для задержки и/или предотвращения старения иммунной системы. В другом варианте осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для применения в качестве адъюванта вакцины, при этом композиции задерживают и/или предотвращают старение иммунной системы.

Заболевания, связанные со старением иммунной системы, включают сердечно-сосудистые заболевания, нейродегенеративные заболевания, такие как болезнь Альцгеймера и болезнь Паркинсона, рак, сахарный диабет 2 типа [] и аутоиммунные расстройства [].

Режимы введения

Предпочтительно, композицию по данному изобретению вводят путем инъекции, предпочтительно подкожно или, альтернативно, внутривенно или внутривенно. Дополнительные подробности относительно композиций, подходящих для введения путем инъекции, представлены в следующем разделе. В альтернативных вариантах осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению предназначены для введения в желудочно-кишечный тракт. Известно, что иммунная система регулируется

присутствием бактерий и бактериальных белков в желудочно-кишечном тракте. Композиции по данному изобретению вводят перорально, но их можно вводить ректально, интраназально или буккальным или подъязычным путями.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению можно вводить в виде пены, в виде спрея или геля.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению можно вводить в виде суппозитория, такого как ректальный суппозиторий, например, в форме композиции на основе масла теоброма (какао-масла), синтетического твердого жира (например, суппоцира, витепсола), глицеро-желатина, полиэтиленгликоля или мыльного глицерина.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению можно вводить в желудочно-кишечный тракт через трубку, такую как назогастральный зонд, орогастральный зонд, желудочный зонд, трубка для еюностомии (J-трубки), чрескожной эндоскопической гастростомии (ЧЭГ), или через порт, такой как порт-система в области грудной стенки, которая обеспечивает доступ к желудку, тонкой кишке, и другие подходящие порты доступа.

Композиции по изобретению можно вводить один раз или же их можно вводить последовательно как часть схемы лечения. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению следует вводить ежедневно.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, лечение по данному изобретению сопровождается оценкой микробиоты кишечника пациента.

Композиции по данному изобретению можно вводить пациенту, у которого был диагностирован рак или который был идентифицирован как подверженный риску развития рака. Композиции также можно вводить в качестве профилактической меры для предотвращения развития рака у здорового пациента.

Композиции по изобретению можно вводить пациенту, который был идентифицирован как имеющий аномальную кишечную микробиоту. Например, у пациента может быть снижена или отсутствовать колонизация *Enterococcus spp.* и, в частности, *Enterococcus gallinarum*.

Как правило, композиции по данному изобретению предназначены для лечения людей, хотя их можно использовать для лечения животных, включая млекопитающих с однокамерным желудком, таких как домашняя птица, свиньи, кошки, собаки, лошади или кролики. Композиции по данному изобретению можно применять для повышения роста и показателей продуктивности животных. При введении животным можно использовать принудительное кормление через зонд.

Композиции

Как правило, композиция по данному изобретению содержит полипептид флагеллина из рода *Enterococcus* и, в частности, из вида *Enterococcus gallinarum*.

В предпочтительных вариантах осуществления данного изобретения, композиция по данному изобретению инкапсулирована для обеспечения доставки флагеллина в кишечник.

Инкапсуляция защищает композицию от деградации, во время доставки в целевую локацию, путем, например, разрушения вследствие химического или физического воздействия, такого как давление, ферментативная активность или физическая дезинтеграция, которое может быть обусловлено изменениями в pH. Может использоваться любой подходящий способ инкапсуляции. Типовые методики инкапсуляции включают включение в пористую матрицу, прикрепление или адсорбцию к поверхности твердого носителя, самоагрегацию посредством флокуляции или захват перекрестно-сшивающими агентами и механическое удержание за микропористой мембраной или в микрокапсуле.

Таким образом, композиции могут быть фармацевтически приемлемыми. Они обычно включают компоненты в дополнение к полипептиду флагеллина (или нуклеиновой кислоте), например, они обычно включают один или более фармацевтических носителей и/или эксципиентов.

Композиции можно вводить человеку в водной форме. Однако в таких вариантах осуществления данного изобретения, перед введением композиция могла быть в неводной форме. Например, хотя некоторые терапевтические средства производятся в водной форме, затем заполняются, распределяются и вводятся также в водной форме, другие терапевтические средства лиофилизируются во время производства и восстанавливаются в водную форму во время применения. Таким образом, композиция по данному изобретению может быть высушена, например, в виде лиофилизированного состава.

Композиция может содержать консерванты, такие как тиомерсал или 2-феноксизтанол. Однако предпочтительно, чтобы терапевтические средства не содержали (т.е. менее чем 5 мкг/мл) ртутного материала, например, не содержали тиомерсал. Более типичны терапевтические средства, не содержащие ртути. Особенно предпочтительны терапевтические средства без консервантов.

Для улучшения термической стабильности композиция может включать термозащитный агент. Более подробная информация о таких агентах представлена ниже.

Для контроля тоничности обычно включают физиологическую соль, например, натриевую соль. Обычно используется хлорид натрия (NaCl), который может присутствовать в количестве от 1 до 20 мг/мл, например, около 10 ± 2 мг/мл NaCl. Другие соли, которые могут присутствовать, включают хлорид калия, дигидрофосфат калия, дигидрат динатрийфосфата, хлорид магния, хлорид кальция и т. д.

Композиции обычно имеют осмоляльность от между 200 мОсм/кг до 400 мОсм/кг, чаще от между 240-360 мОсм/кг и более типично находятся в диапазоне 290-310 мОсм/кг.

Композиции могут включать один или более буферов. Типичные буферы включают: фосфатный буфер; Трис буфер; боратный буфер; сукцинатный буфер; гистидиновый буфер (особенно с адъювантом гидроксидом алюминия); или цитратный буфер. Буферы обычно включают диапазон 5-20 мМ.

pH композиции обычно составляет от между 5,0 до 8,1, а чаще от между 6,0 до 8,0, например, 6,5 и 7,5 или от между 7,0 до 7,8.

Композиция обычно стерильна. Композиция также обычно является апиrogenной,

например, содержащий <1 ЕЭ (единица эндотоксина, стандартная мера) на дозу, например $<0,1$ ЕЭ на дозу. Композиция часто не содержит глютена.

Композиция может включать материал для однократного введения или может включать материал для многократного введения (т.е. «многодозовый» набор). Включение консерванта типично для многодозовых схем. В качестве альтернативы (или в дополнение) к включению консерванта в композиции с несколькими дозами композиции могут содержаться в контейнере, имеющем асептический адаптер для удаления материала.

Терапевтические препараты на основе человеческого белка обычно вводят в объеме дозировки около 0,5 мл, хотя детям можно вводить половину дозы (т.е. около 0,25 мл).

Композиции по данному изобретению также могут содержать один или более иммунорегуляторных агентов. Часто один или более иммунорегуляторных агентов включают один или более адъювантов. Адъюванты могут включать адъювант ТН1 и/или адъювант ТН2, дополнительно обсуждаемые ниже.

Композиции могут быть приготовлены в виде впрыскиваемых лекарственных средств, или в виде жидких растворов, или суспензий. Также могут быть приготовлены твердые формы, подходящие для растворения в, или суспендирования в жидких носителях перед инъекцией (например, лиофилизированная композиция или лиофилизированная композиция, высушенная распылительной сублимационной сушкой). Композиция может быть приготовлена для местного применения, например, в виде мази, крема или порошка. Композиция может быть приготовлена для перорального введения, например, в виде таблетки или капсулы, в виде спрея или сиропа (необязательно с ароматизатором). Композиция может быть приготовлена для пульмонального введения, например, в качестве ингалятора, используя мелкий порошок или спрей. Композиция может быть приготовлена в виде суппозитория или пессария. Композиция может быть приготовлена для назального, ушного или глазного введения, например, в виде капель. Композиция может быть в форме набора, сконструированного таким образом, что комбинированная композиция восстанавливается непосредственно перед введением млекопитающему. Такие наборы могут содержать один или более антигенов в жидкой форме и один или более лиофилизированных антигенов. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, флагеллин по данному изобретению, присутствующий в композиции, может быть слит или конъюгирован с одним или более антигенами.

Если композиция должна быть приготовлена непосредственно перед применением (например, когда компонент представлен в лиофилизированной форме) и представлена в виде набора, набор может включать два флакона или один готовый шприц и один флакон, причем содержимое шприца используется для реактивации содержимого флакона перед инъекцией.

Композиции, используемые в качестве терапевтических средств, содержат иммунологически эффективное количество полипептида или кодирующей нуклеиновой кислоты, а также любые другие компоненты, если это необходимо. Под «иммунологически эффективным количеством» подразумевается, что введение этого количества индивидууму,

либо в виде разовой дозы, либо как часть серии, эффективно для лечения или профилактики. Это количество варьируется в зависимости от здоровья и физического состояния индивидуума, который нуждается в лечении, возраста, таксономической группы индивидуума, который нуждается в лечении (например, примат, отличный от человека, примат и т. д.), способности иммунной системы индивидуума синтезировать антитела, желаемой степени защиты, состава вакцины, оценки лечащим врачом медицинской ситуации и других важных факторов. Ожидается, что это количество будет находиться в относительно широком диапазоне, который можно определить с помощью обычных исследований. Если в композицию входит более одного антигена, тогда два антигена могут присутствовать в той же дозе или в разных дозах.

Как упоминалось выше, композиция может включать термозащитный агент, и этот компонент может быть особенно полезен в композициях с адъювантами (особенно в композициях, содержащих минеральный адъювант, такой как соль алюминия). Как описано в ссылке , жидкий термозащитный агент может быть добавлен к водной композиции вакцины для снижения ее точки замерзания, например, для снижения точки замерзания ниже 0 °C. Таким образом, композиция может храниться при температуре ниже 0 °C, но выше ее точки замерзания, чтобы предотвратить термическое разрушение. Термозащитный агент также позволяет замораживать композицию, одновременно защищая адъюванты минеральных солей от агломерации или осаждения после замораживания и оттаивания, а также может защищать композицию при повышенных температурах, например, выше 40 °C. Исходная водная вакцина и жидкий термозащитный агент могут быть смешаны таким образом, чтобы жидкий термозащитный агент составлял от 1-80% по объему конечной смеси. Подходящие термозащитные агенты должны быть безопасными для введения человеку, легко смешиваться/раствориться в воде и не должны повреждать другие компоненты (например, антиген и адъювант) в композиции. Примеры включают глицерин, пропиленгликоль и/или полиэтиленгликоль (ПЭГ). Подходящие ПЭГ могут иметь среднюю молекулярную массу в диапазоне от 200-20000 Да. В одном варианте осуществления данного изобретения, полиэтиленгликоль может иметь среднюю молекулярную массу около 300 Да («ПЭГ-300»).

Изобретение относится к композиции, содержащей: (i) один или более полипептидов флагеллина; и (ii) термозащитный агент. Эта композиция может быть образована путем смешивания (i) водной композиции, содержащей один или более антигенов, с (ii) термозащитным агентом. Затем смесь можно хранить, например, при температуре ниже 0° C, от 0-20 °C, от 20-35 °C, от 35-55°C или выше. Она может храниться в жидком или замороженном виде. Смесь может быть лиофилизирована. В качестве альтернативы композиция может быть образована смешиванием (i) высушенной композиции, содержащей один или более антигенов, с (ii) жидкой композицией, содержащей термозащитный агент. Таким образом, компонент (ii) можно использовать для восстановления компонента (i).

Композицию можно вводить перорально и она может иметь форму таблетки,

капсулы или порошка. Можно включать другие ингредиенты (например, такие как витамин С) в качестве поглотителей кислорода и пребиотических субстратов для улучшения доставки и/или частичной или полной колонизации, а также выживаемости *in vivo*.

Композиция по данному изобретению включает терапевтически эффективное количество полипептида флагеллина по данному изобретению. Терапевтически эффективное количество полипептида флагеллина достаточно для оказания благоприятного воздействия на пациента.

Композиции по данному изобретению могут содержать фармацевтически приемлемые эксципиенты или носители. Примеры таких подходящих эксципиентов можно найти по ссылке []. Приемлемые носители или разбавители для терапевтического применения хорошо известны в фармацевтической области и описаны, например, в ссылке []. Примеры подходящих носителей включают лактозу, крахмал, глюкозу, метилцеллюлозу, стеарат магния, маннит, сорбит и т. п. Примеры подходящих разбавителей включают этанол, глицерин и воду. Выбор фармацевтического носителя, эксципиента или разбавителя можно осуществлять в соответствии с предполагаемым путем введения и стандартной фармацевтической практикой. Фармацевтические композиции могут содержать в качестве эксципиента или разбавителя, или в дополнение к ним любые подходящие связующие вещества, смазывающие вещества, суспендирующие агенты, вещества для пленочного покрытия, солюбилизующие агенты. Примеры подходящих связующих веществ включают крахмал, желатин, природные сахара, такие как глюкоза, безводная лактоза, лактоза, препятствующая слеживанию и комкованию, бета-лактоза, кукурузные подсластители, природные и синтетические камеди, такие как аравийская камедь, трагакант или альгинат натрия, карбоксиметилцеллюлозу и полиэтиленгликоль. Примеры подходящих смазывающих веществ включают олеат натрия, стеарат натрия, стеарат магния, бензоат натрия, ацетат натрия, хлорид натрия и т. п. В фармацевтической композиции могут присутствовать консерванты, стабилизаторы, красители и даже ароматизирующие агенты. Примеры консервантов включают бензоат натрия, сорбиновую кислоту и сложные эфиры п-гидроксibenзойной кислоты. Также можно использовать антиоксиданты и суспендирующие агенты.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, композиции содержат более одного полипептида флагеллина из рода *Enterococcus* для применения при лечении или профилактике рака. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, композиция содержит полипептид флагеллина с SEQ ID NO: 1 и по меньшей мере один дополнительный полипептид флагеллина из рода *Enterococcus*. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, композиция содержит полипептид флагеллина с SEQ ID NO: 1 и по меньшей мере один дополнительный полипептид флагеллина из вида *Enterococcus gallinarum*. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, композиция содержит полипептид флагеллина с SEQ ID NO: 1 и по меньшей мере один полипептид флагеллина, выбранный из группы, состоящей из последовательностей SEQ ID NO 2-42. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, композиция может

содержать по меньшей мере 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30, 35, 40 или 45 полипептидов флагеллина из рода *Enterococcus* и, в частности, из вида *Enterococcus gallinarum*. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению содержат менее чем 50 полипептидов флагеллина одного и того же вида (например, менее чем 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 12, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4 или 3 штамма) и, необязательно, не содержат полипептидов флагеллина любых других видов. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению включают 1-40, 1-30, 1-20, 1-19, 1-18, 1-15, 1-10, 1-9, 1-8, 1-7, 1-6, 1-5, 1-4, 1-3, 1-2, 2-50, 2-40, 2-30, 2-20, 2-15, 2-10, 2-5, 6-30, 6-15, 16-25 или 31-50 полипептидов флагеллина одного и того же вида и, необязательно, не содержат полипептидов флагеллина любого другого вида.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения в которых композиция по данному изобретению содержит более одного полипептида флагеллина, отдельные полипептиды флагеллина могут быть предназначены для отдельного, одновременного или последовательного введения. Например, композиция может содержать все полипептиды флагеллина, или полипептиды флагеллина могут храниться отдельно и вводиться отдельно, одновременно или последовательно. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, более одного полипептида флагеллина хранятся отдельно, но перед применением их смешивают.

Для композиций для применения в соответствии с изобретением может требоваться разрешение на продажу или нет.

Композиции по данному изобретению могут содержать фармацевтически приемлемые эксципиенты, разбавители или носители.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей: полипептид флагеллина, используемый в данном изобретении; и фармацевтически приемлемый эксципиент, носитель или разбавитель; при этом полипептид флагеллина находится в количестве, достаточном для лечения расстройства, при введении нуждающемуся в этом субъекту.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей: полипептид флагеллина, используемый в данном изобретении; и фармацевтически приемлемый эксципиент, носитель или разбавитель; при этом полипептид флагеллина находится в количестве, достаточном для лечения расстройства, при введении нуждающемуся в этом субъекту; и при этом расстройство представляет собой рак молочной железы. В предпочтительных вариантах осуществления данного изобретения, рак представляет собой карциному молочной железы. В предпочтительных вариантах осуществления данного изобретения, рак представляет собой рак молочной железы IV стадии.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей: полипептид флагеллина, используемый в данном изобретении; и фармацевтически приемлемый эксципиент, носитель или

разбавитель; при этом полипептид флагеллина находится в количестве, достаточном для лечения расстройства, при введении нуждающемуся в этом субъекту; и при этом расстройство представляет собой рак легкого. В предпочтительных вариантах осуществления данного изобретения, рак представляет собой карциному легкого.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей: полипептид флагеллина, используемый в данном изобретении; и фармацевтически приемлемый эксципиент, носитель или разбавитель; при этом полипептид флагеллина находится в количестве, достаточном для лечения расстройства, при введении нуждающемуся в этом субъекту; и при этом расстройство представляет собой рак печени. В предпочтительных вариантах осуществления данного изобретения, рак представляет собой гепатому (гепатоцеллюлярную карциному).

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей: полипептид флагеллина, используемый в данном изобретении; и фармацевтически приемлемый эксципиент, носитель или разбавитель; при этом полипептид флагеллина находится в количестве, достаточном для лечения расстройства, при введении нуждающемуся в этом субъекту; и при этом расстройство представляет собой рак толстой кишки. В предпочтительных вариантах осуществления данного изобретения, рак представляет собой колоректальную аденокарциному.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей: полипептид флагеллина, используемый в данном изобретении; и фармацевтически приемлемый эксципиент, носитель или разбавитель; при этом полипептид флагеллина находится в количестве, достаточном для лечения расстройства, при введении нуждающемуся в этом субъекту; и при этом расстройство представляет собой карциному.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей: полипептид флагеллина, используемый в данном изобретении; и фармацевтически приемлемый эксципиент, носитель или разбавитель; при этом полипептид флагеллина находится в количестве, достаточном для лечения расстройства, при введении нуждающемуся в этом субъекту; и при этом расстройство представляет собой неиммуногенный рак.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей: полипептид флагеллина, используемый в данном изобретении; и фармацевтически приемлемый эксципиент, носитель или разбавитель; при этом полипептид флагеллина находится в количестве, достаточном для лечения расстройства, при введении нуждающемуся в этом субъекту; и при этом расстройство представляет собой иммуногенный рак.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей: полипептид флагеллина, используемый в

данном изобретении; и фармацевтически приемлемый эксципиент, носитель или разбавитель; при этом полипептид флагеллина находится в количестве, достаточном для лечения расстройства, при введении нуждающемуся в этом субъекту; и при этом расстройство выбрано из группы, состоящей из немелкоклеточной карциномы легкого, мелкоклеточной карциномы легкого, плоскоклеточной карциномы, аденокарциномы, железистых опухолей, карциноидных опухолей, недифференцированных карцином.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей: полипептид флагеллина, используемый в данном изобретении; и фармацевтически приемлемый эксципиент, носитель или разбавитель; при этом полипептид флагеллина находится в количестве, достаточном для лечения расстройства, при введении нуждающемуся в этом субъекту; и при этом расстройство выбрано из группы, состоящей из гепатобластомы, холангиокарциномы, холангиоцеллюлярной цистаденокарциномы или рака печени, возникшего в результате вирусной инфекции.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей: полипептид флагеллина, используемый в данном изобретении; и фармацевтически приемлемый эксципиент, носитель или разбавитель; при этом полипептид флагеллина находится в количестве, достаточном для лечения расстройства, при введении нуждающемуся в этом субъекту; и при этом расстройство выбрано из группы, состоящей из инвазивной протоковой карциномы, протоковой карциномы *in situ* или инвазивной дольковой карциномы.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей: полипептид флагеллина по изобретению; и фармацевтически приемлемый эксципиент, носитель или разбавитель; при этом полипептид флагеллина находится в количестве, достаточном для лечения расстройства, при введении нуждающемуся в этом субъекту; и при этом расстройство выбрано из группы, состоящей из острого лимфобластного лейкоза (ALL), острого миелоидного лейкоза, адренокортикальной карциномы, базальноклеточной карциномы, рака желчных протоков, рака мочевого пузыря, опухоли костей, остеосаркомы/злокачественной фиброзной гистиоцитомы, глиомы ствола головного мозга, опухоли головного мозга, астроцитомы мозжечка, астроцитомы головного мозга/злокачественной глиомы, эпендимомы, медуллобластомы, супратенториальных примитивных нейроэктодермальных опухолей, рака молочной железы, бронхиальных аденом/карциноид, лимфомы Беркитта, карциноидной опухоли, рака шейки матки, хронического лимфоцитарного лейкоза, хронического миелолейкоза, хронических миелопролиферативных заболеваний, рака толстой кишки, кожной Т-клеточной лимфомы, рака эндометрия, эпендимомы, рака пищевода, саркомы Юинга, внутриглазной меланомы, ретинобластомы, рака желчного пузыря, рака желудка, карциноидной опухоли желудочно-кишечного тракта, стромальной опухоли желудочно-кишечного тракта (GIST), опухоли зародышевых клеток, глиомы зрительных путей у детей и гипоталамуса, лимфомы Ходжкина, меланомы, островково-

клеточной карциномы, саркомы Капоши, почечно-клеточного рака, рака гортани, лейкоз, лимфомы, мезотелиомы, нейробластомы, неходжкинской лимфомы, рака ротоглотки, остеосаркомы, рака яичников, рака поджелудочной железы, рака паращитовидной железы, рака глотки, аденомы гипофиза, неоплазии плазматических клеток, рака простаты, почечно-клеточной карциномы, ретинобластомы, саркомы, рака яичек, рака щитовидной железы или рака матки.

Доза нуклеиновой кислоты (например, терапевтического средства на основе нуклеиновой кислоты) может содержать ≤ 100 мкг нуклеиновой кислоты; например, от 10-100 мкг, в том числе около 10 мкг, 25 мкг, 50 мкг, 75 мкг или 100 мкг, но экспрессию можно наблюдать на гораздо более низких уровнях; например, с применением ≤ 1 мкг/доза, ≤ 100 нг/доза, ≤ 10 нг/доза, ≤ 1 нг/доза и т. д. Аналогично так же доза белкового антигена может содержать ≤ 100 мкг белка; например от 10-100 мкг, например, около 10 мкг, 25 мкг, 50 мкг, 75 мкг или 100 мкг. Полипептид можно вводить в дозе около 0,1-10 мг/кг веса тела.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, фармацевтические композиции по данному изобретению можно вводить в виде однократной дозы или, более предпочтительно, в повторных дозах. Предпочтительно повторные дозы вводят около каждые 2, 5, 10, 7, 10 или 15 дней. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, данное изобретение относится к указанной выше фармацевтической композиции, при этом композиция вводится в дозе 100 мкг/кг, 200 мкг/кг, 300 мкг/кг, 400 мкг/кг, 500 мкг/кг, 1 мг/кг, 2 мг/кг, 5 мг/кг, 10 мг/кг, 20 мг/кг, 30 мг/кг, 50 мг/кг, 100 мг/кг, 200 мг/кг или 500 мг/кг массы тела субъектов. Подходящие стандартные дозы включают 1 мг, 2 мг, 5 мг, 10 мг, 20 мг, 30 мг, 50 мг, 100 мг, 200 мг, 500 мг, 1000 мг, 100-500 мг, 500-1000 мг, 200-400 мг, 5-00-750 мг, 750-1000 мг.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, данное изобретение относится к указанной выше фармацевтической композиции, содержащей клетки-хозяева по данному изобретению. Подходящая суточная доза клеток-хозяев, например, для взрослого человека, может составлять от около 1×10^3 до около 1×10^{11} колониеобразующих единиц (КОЕ); например, от около 1×10^7 до около 1×10^{10} КОЕ; в другом примере - от около 1×10^6 до около 1×10^{10} КОЕ.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, композиция содержит клетку-хозяин в количестве от около 1×10^6 до около 1×10^{11} КОЕ/г относительно массы композиции; например, от около 1×10^8 до около 1×10^{10} КОЕ/г. Доза может составлять, например, 1 г, 3 г, 5 г и 10 г. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, композиция содержит смесь живых клеток-хозяев и клеток-хозяев, которые были убиты.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, данное изобретение относится к указанной выше фармацевтической композиции, при этом композиция вводится способом, выбранным из группы, состоящей из перорального, ректального, подкожного, назального, буккального, сублингвального, подкожного, внутривенного и внутримышечного введений.

В определенных вариантах осуществления данного изобретения, данное

изобретение относится к указанной выше фармацевтической композиции, содержащей носитель, выбранный из группы, состоящей из лактозы, крахмала, глюкозы, метилцеллюлозы, стеарата магния, маннита и сорбита.

В определенных вариантах осуществления данного изобретения, данное изобретение относится к указанной выше фармацевтической композиции, содержащей разбавитель, выбранный из группы, состоящей из этанола, глицерина и воды.

В определенных вариантах осуществления данного изобретения, данное изобретение относится к указанной выше фармацевтической композиции, содержащей эксципиент, выбранный из группы, состоящей из крахмала, желатина, глюкозы, безводной лактозы, лактозы, препятствующей слеживанию и комкованию, бета-лактозы, кукурузного подсластителя, аравийской камеди, трагаканта, альгината натрия, карбоксиметилцеллюлозы, полиэтиленгликоля, олеата натрия, стеарата натрия, стеарата магния, бензоата натрия, ацетата натрия и хлорида натрия.

В определенных вариантах осуществления данного изобретения, данное изобретение относится к указанной выше фармацевтической композиции, дополнительно содержащей по меньшей мере одно из консерванта, антиоксиданта и стабилизатора.

В определенных вариантах осуществления данного изобретения, данное изобретение относится к указанной выше фармацевтической композиции, содержащей консервант, выбранный из группы, состоящей из бензоата натрия, сорбиновой кислоты и сложных эфиров п-гидроксибензойной кислоты.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, данное изобретение относится к указанной выше фармацевтической композиции, в которой, когда композиция хранится в герметичном контейнере при температуре около 4°C или около 25 °C, и контейнер помещается в атмосферу имеющую относительную влажность 50%, по меньшей мере 80% бактериального штамма, измеренного в колониеобразующих единицах, остается после периода, составляющего по меньшей мере около: 1 месяц, 3 месяца, 6 месяцев, 1 год, 1,5 года, 2 года, 2,5 года или 3 года.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, композиция по данному изобретению представлена в запечатанном контейнере, содержащем композицию, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, герметичный контейнер представляет собой саше или бутылку. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, композиция по данному изобретению представлена в шприце, содержащем композицию, как описано в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, композиция по данному изобретению может быть представлена в виде фармацевтического состава. Например, композиция может быть представлена в виде таблетки или капсулы. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, капсула представляет собой желатиновую капсулу («желатиновая капсула»).

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, композиции по данному изобретению вводят перорально. Пероральное введение может включать

проглатывание так, что соединение попадает в желудочно-кишечный тракт, или буккальное, язычное или подъязычное введение, посредством которого соединение попадает в кровоток непосредственно из рта.

Фармацевтические составы, подходящие для перорального введения, включают твердую прессованную массу, твердые микрочастицы, полутвердые и жидкие (в том числе многофазные или дисперсионные системы), такие как таблетки; мягкие или жесткие капсулы, содержащие мульти- или нано-частицы, жидкости (например, водные растворы), эмульсии или порошки; леденцы (в том числе заполненные жидкостью); жевательные таблетки; гели; быстродиспергируемые дозированные формы; пленки; капсулы; спреи; и буккальные/мукоадгезивные пластыри.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, фармацевтический состав может быть кишечнорастворимым составом, т. е. устойчивым к действию желудочного сока формой (например, устойчивой к желудочному pH), который подходит для доставки композиции по данному изобретению в кишечник путем перорального введения. Энтеросолюбильные составы могут быть особенно полезны, когда бактерии или другой компонент композиции чувствительны к кислоте, например, склонны к разложению в условиях желудка.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, энтеросолюбильный состав содержит кишечнорастворимое покрытие. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, состав представляет собой лекарственную форму с кишечнорастворимым покрытием. Например, состав может представлять собой таблетку с кишечнорастворимым покрытием или капсулу с кишечнорастворимым покрытием и т. п. Кишечнорастворимое покрытие может представлять собой традиционное кишечнорастворимое покрытие, например, традиционное покрытие для таблетки, капсулы или т. п. для пероральной доставки. Состав может содержать пленочное покрытие, например, тонкую пленку, слой кишечнорастворимого полимера, например, нерастворимого в кислоте полимера.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, энтеросолюбильный состав может быть кишечнорастворимым по своей природе, например, устойчивым к действию желудочного сока, без необходимости в кишечнорастворимом покрытии. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления данного изобретения, состав представляет собой энтеросолюбильный состав, не содержащий кишечнорастворимое покрытия. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, состав представляет собой капсулу, изготовленную из термогелеобразователя. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, термогелеобразователь представляет собой целлюлозный материал, такой как метилцеллюлоза, гидроксиметилцеллюлоза или гидроксипропилметилцеллюлоза (HPMC - hydroxypropylmethylcellulose). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, капсула содержит оболочку, которая не содержит никакого пленкообразующего полимера. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, капсула содержит оболочку, а оболочка содержит

гидроксипропилметилцеллюлозу и не содержит пленкообразующего полимера (например, см. []). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, состав представляет собой кишечнорастворимую по своей природе капсулу (например, Vcaps® от Capsugel).

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, состав представляет собой мягкую капсулу. Мягкие капсулы представляют собой капсулы, которые могут, благодаря добавлению размягчителей, таких как, например, глицерин, сорбит, маннит и полиэтиленгликоли, присутствующих в оболочке капсулы, иметь определенные эластичность и мягкость. Мягкие капсулы можно получать, например, на основе желатина или крахмала. Мягкие капсулы на основе желатина коммерчески доступны от разных поставщиков. В зависимости от способа введения, например, перорального или ректального, мягкие капсулы могут иметь разные формы, они могут быть, например, круглыми, овальными, продолговатыми или торпедообразными. Мягкие капсулы можно получать традиционными способами, такими как, например, способ Шерера, способ Assogel или капельным или обдувным способом.

Общие положения

В практике по данному изобретению будут использоваться, если не указано иное, стандартные методы химии, биохимии, молекулярной биологии, иммунологии и фармакологии и фармакологии в пределах квалификации в данной области техники. Такие методики подробно описаны в литературе. См., например, ссылки [] и [-], и т.д.

Термин «содержащий» охватывает значение «включающий», а также «состоящий из», например, композиция, «содержащая» X, может состоять исключительно из X или же может содержать некоторые дополнительные элементы, например, X+Y.

Термин «около» в связи с числовым значением x является необязательным и означает, например, $x \pm 10\%$.

Выражение «по существу» не исключает значение «полностью», например, композиция, которая «по существу» свободна от Y, может быть полностью свободной от Y. При необходимости, выражение «по существу» может быть исключено из определения по изобретению.

Термин «полипептиды флагеллина из рода *Enterococcus*» охватывает полипептиды флагеллина дикого типа и мутантные полипептиды флагеллина, которые проявляют иммуностимулирующие свойства, например, которые могут эффективно активировать ответы TLR5. Термин «полипептиды флагеллина» также охватывает фрагменты полипептидов флагеллина дикого типа и мутантные полипептиды флагеллина, которые проявляют иммуностимулирующие свойства, например, которые могут эффективно активировать ответы TLR5.

Ссылки на процент идентичности последовательности между двумя белковыми последовательностями означают, что при выравнивании этот процент аминокислотных остатков является одинаковым при сравнении двух последовательностей. Такое выравнивание и процент гомологии или идентичности последовательности можно определить, используя программное обеспечение, известное в данной области техники,

например, описанное в ссылке []. Предпочтительный способ использует выравнивание MUSCLE белковых последовательностей и может быть выполнен с помощью Geneious (78,02% попарной идентичности), матрицы весов Blossum62, порог=1.

Ссылки на процент идентичности последовательности между двумя нуклеотидными последовательностями означают, что при выравнивании этот процент нуклеотидов является одинаковым при сравнении двух последовательностей. Такое выравнивание и процент гомологии или идентичности последовательности можно определить, используя программное обеспечение, известное в данной области техники, например, описанное в разделе 7.7.18 ссылки []. Предпочтительное выравнивание определяют по алгоритму поиска гомологии Смита - Уотермана, используя аффинный поиск гэпов со штрафом за открытие гэпа 12 и штрафом за продление гэпа 2, матрицу BLOSUM 62. Алгоритм поиска гомологии Смита-Уотермана описан в ссылке [].

Обычно, если не указано иное (например, в отношении фрагментов), идентичность последовательности вычисляется по длине эталонной последовательности (например, SEQ ID NO: 1), а не по длине запрашиваемой последовательности. Следовательно, короткие и нерелевантные последовательности не считаются имеющими высокую идентичность последовательностей с последовательностями по данному изобретению.

Если специально не указано иное, процесс или способ, включающий ряд этапов, может содержать дополнительные этапы в начале или конце способа или может содержать дополнительные промежуточные этапы. Также этапы могут быть объединены, исключены или проведены в альтернативном порядке в случае необходимости.

В данном документе описаны различные варианты реализации. Следует понимать, что признаки, установленные в каждом варианте осуществления данного изобретения, можно комбинировать с другими установленными признаками, чтобы обеспечить дополнительные варианты осуществления данного изобретения. В частности, варианты осуществления данного изобретения, описанные в данном документе как подходящие, типичные или предпочтительные, можно комбинировать друг с другом (за исключением случаев, когда они взаимоисключающие).

СПОСОБЫ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Пример 1 - Активация TLR5 репортерных клеток с помощью MRx0518

Краткое содержание

В этом исследовании проверялась эффективность бактериального штамма MRx0518 для активации TLR5 репортерных клеток.

Анализ активации TLR5

Клетки HEK-Blue TLR5 представляют собой клетки HEK293, совместно трансфицированные геном TLR5 человека и индуцибельным репортерным геном SEAP (секретируемая эмбриональная щелочная фосфатаза). Ген SEAP находится под контролем минимального промотора ИФН- β , слитого с пятью сайтами связывания NF- κ B и AP-1. Стимуляция лигандом TLR5 активирует NF- κ B и AP-1, которые индуцируют продукцию SEAP. Таким образом, уровень щелочной фосфатазы связан с активностью TLR5.

Материалы

Линия репортерных клеток: HEK-Blue hTLR5 (Invivogen, hkb-htr5)

Среда для роста клеток: DMEM (Sigma, D6171) с добавлением 10% (об./об.) ФБС (Sigma, F9665), 4 mM L-глутамина (Sigma, G7513), 100 Ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина (Sigma, P4333), 100 мкг/мл нормоцина (Invivogen, ant-nr-1) и селективных антибиотиков бластицидина (30 мкг/мл, Invivogen, ant-bl-05) и зеоцина (100 мкг/мл, Invivogen, ant-zn-1)

Среда без антибиотиков: DMEM с добавлением 10% (об./об.) ФБС и 4 mM L-глутамина

Условия роста бактерий

Условия роста бактерий: Все культуры *Enterococcus gallinarum* MRx0518 выращивали в питательной среде дрожжевой экстракт-гидролизат казеина-жирные кислоты (YCFA) (E&O Laboratories, Великобритания) при 37°C в анаэробных условиях.

Клетки MRx0518 в стационарной фазе: 16-18-часовые культуры штамма MRx0518 выращивали в условиях, описанных выше, с использованием 1% инокулята клеток MRx0518, хранимых замороженными в виде рабочих банков клеток при -80°C.

Клетки MRx0518 в поздней логарифмической фазе: 3-часовые (приблизительно) культуры штамма MRx0518 выращивали в условиях, описанных выше, с использованием 10% инокулята клеток MRx0518 стационарной фазы.

Процедура

Анализ активации TLR5 проводили со следующими обработками в двух дозах - 10:1 (3×10^5 бактерий) или 100:1 (3×10^6 бактерий):

Живые бактерии MRx0518

Убитые нагреванием бактерии MRx0518

CFS из MRx0518

Положительный контроль выполняли с использованием ультрачистого FLA-ST в концентрации 20 нг/мл и 5 нг/мл. Отрицательный контроль выполняли со средой без антибиотиков, не содержащей репортерных клеток, для контроля продукции щелочной фосфатазы чем-либо, отличным от репортерных клеток. Два дополнительных контроля были выполнены с YCFA и водой. Для всех обработок были выполнены три повтора.

Приготовление живого и бесклеточного супернатанта (CFS - cell-free supernatant) MRx0518

Обработки с MRx0518Live и CFS получали из одной 10 мл культуры клеток MRx0518 поздней логарифмической фазы после центрифугирования клеток при 5000 x g в течение 5 минут при комнатной температуре. Бактериальный осадок промывали один раз в PBS (Sigma, D8537) и ресуспендировали в среде без антибиотиков до расчетной плотности $1,4 \times 10^8$ КОЕ/мл (2-кратное разведение) и $1,4 \times 10^7$ КОЕ/мл (20-кратное разведение). Бактериальный супернатант собирали, фильтровали (0,22 мкм) в стерильных условиях и разбавляли в 10 и 20 раз, используя H₂O (Sigma, W3500), чтобы получить эквиваленты суспензий бактерий, описанных выше. CFS содержит жгутики MRx0518, сброшенные в

супернатант.

Приготовление убитых нагреванием (НК - heat killed) клеток

Отдельно НК клетки получали путем инкубации 10 мл культуры клеток MRx0518 поздней логарифмической фазы при 80°C в течение 40 минут. После центрифугирования (условия, описанные выше) супернатант культуры удаляли, а осадок клеток промывали один раз в PBS (Sigma, D8537) и ресуспендировали в среде без антибиотиков до расчетной плотности $1,4 \times 10^8$ КОЕ/мл (2-кратное разведение) и $1,4 \times 10^7$ КОЕ/мл (20-кратное разведение). После приготовления все препараты перед применением хранили на льду. Количество жизнеспособных клеток на мл определяли для всех препаратов живых и убитых нагреванием клеток MRx0518.

Приготовление положительного контроля

Известный агонист TLR5, флагеллин *S. typhimurium* (ультрачистый, FLA-ST ультрачистый от Invitrogen, tlrl-epsitfla) получали в концентрации 200 нг/мл или 50 нг/мл в H₂O.

Условия анализа TLR5

20 мкл соответствующей обработки (бактериальные клетки, бесклеточный супернатант, лиганды положительного контроля, рекомбинантный флагеллин, отрицательные контроли, например, YCFA, среду без антибиотиков, H₂O, PBS) помещали в двух или трех повторах в 96-луночные планшеты для культивирования клеток (Sigma, CLS3596). 180 мкл суспензии репортерных клеток добавляли в каждую лунку, чтобы получить конечный объем 200 мкл и конечную концентрацию клеток HEK-blue TLR5 3×10^4 . Образцы инкубировали при 37 °C, 5% CO₂ в течение 22 часов.

После инкубации 20 мкл образца добавляли к 180 мкл субстрата Quantibblue (Invivogen, ger-qb1) в новом 96-луночном планшете и инкубировали при 37 °C, 5% CO₂ в течение 2 часов. Планшеты, содержащие Quantibblue, считывали на считывающем устройстве для микропланшетов (Bio-Rad, iMark), снимая показания оптической плотности при 655 нм. Результаты были усреднены из технических повторов, а затем независимые эксперименты усреднены после этого для предоставления данных для окончательных графиков.

Выводы

Обработка живым и инактивированным нагреванием MRx0518 приводила к промежуточным и высоким уровням ответов TLR5. Эти данные демонстрируют, что штамм MRx0518 способен индуцировать ответ TLR5 и что этот ответ не устраняется тепловой инактивацией. Эти данные предполагают, что флагеллин из рода *Enterococcus* и, в частности, флагеллин MRx0518 может вызывать ответ TLR5 и что флагеллин термостабилен.

Самый высокий уровень активности TLR5 наблюдался после обработки MRx0518-CFS и был даже выше, чем у известного агониста TLR5 FLA-ST (Фиг. 6). CFS содержит жгутики MRx0518, сброшенные в супернатант. Эти данные демонстрируют, что флагеллин из рода *Enterococcus* и, в частности, из MRx0518 вызывает очень сильный ответ TLR5, и

поэтому может быть полезен в терапии, в частности, при лечении рака. Эти данные также показывают, что MRx0518 эффективно выделяет свой флагеллин в супернатант.

Пример 2 - Активация TLR5 с помощью CFS особенно сильна для MRx0518

Краткое содержание

В этом исследовании проверялось, изменяется ли активация TLR5 при применении CFS между штаммами. Оба MRx0518 и DSM100110 представляют собой имеющие жгутики штаммы *Enterococcus gallinarum*. Было проведено исследование для выяснения приводит ли CFS от обоих этих штаммов к ответу TLR5.

Анализ активации TLR5

Был проведен анализ TLR5, как описано в Примере 1.

Процедура

Анализ активации TLR5 проводили со следующими обработками в двух дозах - 10:1 или 100:1:

MRx0518-CFS

DSM100110-CFS

Было выполнено три отрицательных контроля со средой без антибиотиков, YCFA и водой. Положительный контроль осуществляли с использованием ультрачистого FLA-ST в концентрации 20 нг/мл. Для всех обработок были выполнены три повтора.

Выводы

MRx0518-CFS был способен стимулировать сильный ответ TLR5. DSM100110-CFS также вызвал ответ TLR5 при MOI 100:1, хотя он был снижен по сравнению с MRx0518-CFS. Эти данные демонстрируют, что, хотя супернатант от обоих штаммов вызывал иммуностимулирующий ответ, он варьируется между штаммами. Эти данные неожиданны, поскольку штаммы MRx0518 и DSM100110 оба являются имеющими жгутики штаммами *Enterococcus gallinarum*. MRx0518-CFS дает более сильный ответ TLR5 по сравнению с DSM100110-CFS, возможно потому, что MRx0518 обладает улучшенной способностью сбрасывать свой флагеллин в супернатант по сравнению с другими штаммами *Enterococcus gallinarum*, что может сделать его особенно полезным в терапии.

Эти данные предполагают, что полипептиды флагеллина из рода *Enterococcus* могут быть эффективными для применения при лечении или профилактике рака, в частности рака, который связан с TLR5, например, рака молочной железы, колоректального рака и рака желудка.

Пример 3 - Активация TLR5 после обработки трипсином

Краткое содержание

В этом исследовании проверялось, является ли активация TLR5 MRx0518-CFS трипсин-зависимой.

Анализ активации TLR5

Был проведен анализ TLR5, как описано в Примере 1.

Процедура

Анализ активации TLR5 проводили со следующими обработками в двух дозах - 10:1

или 100:1: отдельно или в комбинации с трипсином:

MRx0518-CFS

DSM100110-CFS

YCFA

Для всех обработок были выполнены три повтора.

CFS расщепляли с помощью 500 мкг/мл трипсина (профильтрованный через 0,22 мкм, Sigma, T3924) или эквивалентного объема носителя трипсина (сбалансированный солевой раствор Хэнка, Fisher Scientific, 1175129) в качестве имитационного контроля расщепления в течение 1 часа при 37 °C, 5% CO₂. После инкубации к расщепленным и имитационно расщепленным образцам CFS добавляли ФБС до конечной концентрации 10% (об./об.) для ингибирования активности трипсина.

Было выполнено три отрицательных контроля со средой без антибиотиков, HBSS и водой. Положительный контроль осуществляли с использованием ультрачистого FLA-ST в концентрации 20 нг/мл.

Выводы

Активация TLR5 с помощью MRx0518-CFS аннулировалась обработкой трипсином (Фиг. 8). Эти данные демонстрируют, что ответ TLR5 активируется белками в MRx0518-CFS. Деградация этих белков трипсином устраняет ответ TLR5. Белок флагеллина MRx0518 (FlaA_{MRx0518}) содержит 36 сайтов расщепления трипсином, некоторые из которых расположены в доменах взаимодействия TLR5.

Пример 4 - Активация TLR5 очищенными белками флагеллинами

Краткое содержание

В этом исследовании тестировались стимулирующие профили очищенного флагеллина MRx0518 и DSM100110.

Производство рекомбинантных белков флагеллинов

Обзор стратегии клонирования продемонстрирован на Фиг. 9а. Полноразмерные гены флагеллина MRx0518 и DSM100110 клонировали в рекомбинантную экспрессирующую конструкцию pQE-30 (которая имеет N-концевую 6xHis-метку) с использованием расщепления рестрикционным ферментом для получения конструкций pQE-30-FlaA_{MRx0518} и pQE-30-FlaA_{DSM100110}. Положительные колонии идентифицировали с помощью ПЦР колоний, расщепления рестрикционными ферментами и методик секвенирования ДНК хорошо известных в данной области техники.

Рекомбинантные белки флагеллины, FlaA_{MRx0518} и FlaA_{DSM100110}, были экспрессированы в клетках *E.coli* и очищены с использованием аффинной хроматографии с использованием иммобилизованных металлов и элюции имидазола с последующим удалением эндотоксина (см. Таблицу ниже). В результате получают препараты высокой чистоты с минимальным уровнем эндотоксина. Размер и чистоту белков подтверждали с помощью геля SDS-PAGE (Фиг. 9b).

	FlaA _{MRx0518}	FlaA _{DSM100110}	Носитель
Объем (мл)	5	10	10

Количество белка (мг)	3,13	6,26	0
Концентрация белка (мг/мл)	0,625	0,626	0
Эндотоксин (ЕЭ/мл)	0,88	0,99	0
Буфер	PBS	PBS	PBS
ДСН-ПААГ-электрофорез (SDS-PAGE)	Незначительные примеси	Незначительные примеси	Отсутствие полосы

Ответ на очищенные рекомбинантные белки FlaA_{MRx0518} и FlaA_{DSM100110} в зависимости от дозы

Был проведен анализ TLR5, как описано в Примере 1.

Процедура

Анализ активации TLR5 проводили со следующими видами лечения:

Рекомбинантный очищенный FlaA_{MRx0518} в концентрациях 5, 1, 0,2, 0,04 и 0,008 нг/мл

Рекомбинантный очищенный FlaA_{DSM100110} в концентрациях 5, 1, 0,2, 0,04 и 0,008 нг/мл

Отрицательный контроль выполняли с носителем FLA в концентрации 5 нг/мл, а положительный контроль выполняли с использованием сверхчистого FLA-ST в концентрации 20 нг/мл. Для каждой обработки было выполнено три повтора.

Выводы

И рекомбинантный FlaA_{MRx0518}, и FlaA_{DSM100110} могут активировать ответы TLR5. На Фиг. 10 сравнивается активация TLR5 различными дозами рекомбинантного FlaA_{MRx0518} и FlaA_{DSM100110} при обработках, описанных в примерах 3 и 4. При концентрации 5 нг/мл оба рекомбинантных белка флагеллина могут вызывать ответ TLR5, который выше, чем ответ, вызываемый хорошо известным агонистом TLR5 FLA-ST, при использовании более высокой концентрации (20 нг/мл). Эти данные показывают, что полипептиды флагеллина из вида *Enterococcus gallinarum* более эффективны при активации ответа TLR5, чем *S. typhimurium*. Известно, что полипептиды флагеллина из *S. typhimurium* подавляют рост опухоли за счет активации TLR5. Таким образом, эти данные предполагают, что полипептиды флагеллина из *Enterococcus gallinarum* более эффективны, чем полипептиды флагеллина из *S. typhimurium*, при лечении или профилактике рака.

FlaA_{MRx0518} и FlaA_{DSM100110} имеют разные иммуностимулирующие профили. При концентрациях 1 нг/мл и 0,2 нг/мл FlaA_{MRx0518} вызывает примерно в пять раз более сильный ответ TLR5, чем FlaA_{DSM100110}. И MRx0518, и DSM100110 являются штаммами, родственными друг другу. Оба являются имеющими жгутики штаммами *Enterococcus gallinarum*, однако они экспрессируют принципиально разный флагеллин, имеющий разные иммуностимулирующие профили. Неожиданная находка, что FlaA_{MRx0518} является сильным активатором TLR5, демонстрирует, что этот полипептид флагеллина особенно эффективен при лечении или профилактике рака.

Эти примеры демонстрируют, что полипептиды флагеллина из рода *Enterococcus* являются агонистами TLR5. Агонисты TLR5 участвуют в лечении Т- и В-клеточных лимфом. Следовательно, полипептиды флагеллина из рода *Enterococcus* могут быть особенно эффективными при лечении или профилактике Т- и В-клеточных лимфом.

Было показано, что активация TLR5 уменьшает повреждение тканей, вызванное радиацией. Примеры демонстрируют, что полипептиды флагеллина из рода *Enterococcus* являются сильными активаторами ответа TLR5. Следовательно, полипептиды флагеллина из рода *Enterococcus* и, в частности, вида *Enterococcus gallinarum*, могут быть особенно эффективны для уменьшения повреждения тканей, вызванного радиацией.

Пример 5 - Получение мутанта MRx0518 *flaA*⁻

Краткое содержание

Был создан инсерционный мутант MRx0518, у которого разрушен ген флагеллина.

Условия эксперимента

Внутренний фрагмент *flaA* был клонирован в вектор pORI19 (*repA*⁻). Полученные в результате векторы *flaA*_{MRx0518}int-pORI19 были трансформированы в MRx0518, а вставку интегрировали в бактериальный геном с использованием гомологичной рекомбинации (см. Фиг. 13).

Положительные колонии скринировали на наличие гена *em* и использовали ПЦР, и далее подтверждали с помощью секвенирования. Фенотипический анализ мутантов с использованием тестов подвижности также подтвердил наличие инсерционного мутанта MRx0518 *flaA*⁻. Вставка содержит устойчивость к эритромицину из вектора pORI19. На Фиг. 11 продемонстрировано, что мутант MRx0518 *flaA*⁻ неподвижен на агаре для исследования подвижности BBL с добавлением 20 мкг/мл эритромицина по сравнению с диким типом.

Пример 6 - Активация TLR5 устранена в мутанте MRx0518

Краткое содержание

Была протестирована способность CFS из мутанта MRx0518 *flaA*⁻ активировать ответ TLR5.

Анализ активации TLR5

Был проведен анализ TLR5, как описано в Примере 1.

Процедура

Анализ активации TLR5 проводили со следующими обработками в двух дозах - 10:1 или 100:1:

MRx0518-CFS

MRx0518 *flaA*⁻-CFS

Положительные контроли были выполнены с использованием ультрачистого FLA-ST в концентрациях 5 нг/мл и 20 нг/мл. Отрицательный контроль проводили с YFCA в двух дозах - 10:1 и 100:1. Для всех обработок были выполнены три повтора.

Выводы

Способность MRx0518-CFS стимулировать ответ TLR5 была устранена у мутанта MRx0518 *flaA*⁻ (Фиг. 12). Эти данные демонстрируют, что полипептид флагеллина

необходим для активации ответа TLR5 с помощью MRx0518-CFS.

Пример 7 - Характеристика MRx0518

Краткое содержание

Морфология бактерий, такая как размер, наличие или отсутствие фимбрий/жгутиков/пилей, или наличие внеклеточного матрикса, влияет как на подвижность, так и на прилипание, и поэтому важна для характеристики бактерий.

Культуры MRx0518 были исследованы на электронно-микроскопическом уровне (сканирующий и трансмиссионный), чтобы позволить визуализировать структуру бактерий с более высоким разрешением и увеличением, чем это позволяют обычные методы световой микроскопии.

Методология

Трансмиссионная электронная микроскопия

Аликвоту бактериальной культуры MRx0518 в экспоненциальной фазе получали непосредственно из анаэробного вытяжного шкафа в запечатанной пробирке Eppendorf. Культуры фиксировали в свежеприготовленном ледяном 2,5%-ном глутаральдегиде 0,1 M Na на какодилате с pH 7,2. Пробирка Eppendorf была осторожно перевернута несколько раз перед тем, как была помещена на лед и оставлена для фиксации на 3-5 минут. После фиксации бактерии ненадолго центрифугировали до получения осадка и ресуспендировали в очищенной воде Milli. С помощью стеклянной пипетки одну каплю фиксированной культуры наносили на медные сетки размером 300 меш (mesh), покрытые формваром. Бактериям давали возможность осесть и адсорбироваться в течение приблизительно 1-2 минут, а избыток раствора удалили с сетки с помощью фильтровальной бумаги Whatman No3. 10 мкл 2% уранилацетата наносили на сетку на несколько секунд и удаляли капиллярным действием, используя фильтровальную бумагу, как указано выше. Сеткам дали полностью высохнуть перед их исследованием в TEM Philips CM100 при различных напряжениях кV.

Сканирующая электронная микроскопия

Аликвоту из той же культуры, что и выше, брали для анализа при помощи SEM. Бактерии фиксировали, как указано выше, но не осаждали. Фильтры SPI PORE (диаметр 25 мм, размер пор 0,2 мкм) предварительно обрабатывали 0,01% полилизинном непосредственно перед тем, как фиксированные бактерии проталкивали через шприц Luer-Lok на фильтр. Затем осторожно пропускали через фильтр 1 мл очищенной воды Milli. Фильтры были нарезаны по необходимому размеру и обезвожены с помощью серии растворов этанола (50%, 70% 90% и 3х 100%). Затем фильтры были последовательно погружены в возрастающие концентрации гексаметилдисилазана (HMDS 25%, 50%, 75% в этаноле) с заключительной стадией дегидратации, проводимой с использованием 100% HMDS. Затем ему давали испариться в течение ночи. Фильтры были высушены до критической точки и покрыты 10 нм золотом и палладием перед исследованием в сканирующем электронном микроскопе Zeiss EVO MA10.

Выводы

Оба метода визуализации на уровне электронного микроскопа показали, что MRx0518 имеет жгутики (Фиг. 14). И TEM, и SEM анализ продемонстрировали, что MRx0518 имеет жгутики (сплошные белые стрелки). Размер ячеек составлял 1-2 мкм. Наличие везикул наружной мембраны было очевидно только на изображениях MRx0518, полученных с помощью SEM. SEM изображение демонстрирует то, что похоже на везикулы внешней мембраны (белая пунктирная стрелка).

Пример 8 - Активация мышинового TLR5 рекомбинантными белками флагеллинами из штаммов *Enterococcus gallinarum* MRx0518 и DSM 100110

Краткое содержание

MRx0518 - это бактериальный штамм, выделенный из образца человека, тогда как DSM 100110 имеет мышинное происхождение. Была протестирована способность рекомбинантных белков флагеллинов из штаммов *Enterococcus gallinarum* MRx0518 и DSM 100110 активировать мышинный TLR5.

Методология

Рекомбинантные очищенные MRx0518 (FliC_{MRx0518}) и DSM 100110 (FliC_{DSM100110}) получали, как описано в Примере 4.

Был проведен анализ TLR5, как описано в Примере 1. Анализ активации TLR5 проводили со следующими видами лечения:

Рекомбинантный очищенный FliC_{MRx0518} в концентрациях 5, 1, 0,2, 0,04 и 0,008 нг/мл

Рекомбинантный очищенный FliC_{DSM100110} в концентрациях 5, 1, 0,2, 0,04 и 0,008 нг/мл

Были выполнены три независимых повтора.

Выводы

И FliC_{MRx0518} и FliC_{DSM100110} активировал мышинный TLR5, и не было разницы в уровнях активации между FliC_{MRx0518} и FliC_{DSM100110} при любой дозе (Фиг. 15). Этот эффект отличается от результатов, наблюдаемых для активации человеческого TLR5 с помощью FliC_{MRx0518} и FliC_{DSM100110}. Как показано в примере 4, Фиг. 10, FliC_{MRx0518} может стимулировать TLR5 человека до более высоких уровней, чем FliC_{DSM100110} при концентрациях 1 нг/мл и ниже. Без привязки к какой-либо конкретной теории, разные профили активации человеческого и мышинового TLR5 рекомбинантными белками флагеллинами из разных штаммов *Enterococcus gallinarum* могут быть связаны с различиями в последовательностях между FliC_{MRx0518} и FliC_{DSM100110}, а также с вариабельностью сайтов связывания между человеческим и мышинным TLR5.

Как показано на Фиг. 3, авторы изобретения отметили, что большая часть вариации последовательности между различными полипептидами флагеллина наблюдается на участке D2-D3. Выравнивание последовательностей FliC_{MRx0518} и FliC_{DSM100110} демонстрирует большую вариацию в домене D2-D3 (Фиг. 16). Выравнивание проводили с использованием программного обеспечения для множественного выравнивания последовательностей CLUTAL OMEGA v1.2.4.

Пример 9 - Иммуностимулирующая способность подвижных штаммов *E. gallinarum*

и *E. casseliflavus*, полученных от человека

Краткое содержание

Оценивали способность подвижных штаммов *E. gallinarum* и *E. Casseliflavus*, полученных от человека, активировать TLR5 человека *in vitro*.

Методология

Бактериальные штаммы протестированы

Название штамма	Виды
MRx0518	<i>E. gallinarum</i>
Тест 1	<i>E. gallinarum</i>
Тест 2	<i>E. gallinarum</i>
Тест 3	<i>E. gallinarum</i>
MRx0554	<i>E. gallinarum</i>
MRx0556	<i>E. gallinarum</i>
MRx1548	<i>E. gallinarum</i>
MRx1649	<i>E. gallinarum</i>
MRx1650	<i>E. gallinarum</i>
MRx1763	<i>E. gallinarum</i>
MRx1766	<i>E. gallinarum</i>
MRx1775	<i>E. gallinarum</i>
Тест 4	<i>E. casseliflavus</i>
Тест 5	<i>E. casseliflavus</i>
Тест 6	<i>E. casseliflavus</i>
DSM25781	<i>E. casseliflavus</i>

MRX и тестируемые штаммы были изолированы от одного из четырех доноров из коллекции культур 4D Pharma (номера доноров F00, F14, F19 и F22).

Условия анализа TLR5

Штаммы бактерий культивировали в питательной среде YCFA (E&O Laboratories, Боннибридж, Шотландия, Великобритания) до тех пор, пока они не достигли стационарной фазы роста. Клетки и супернатанты разделяли центрифугированием при 5000 x g в течение 5 минут. Супернатанты пропускали через фильтр 0,22 мкм и разбавляли водой.

Клетки HEK-Blue™-hTLR5 (InvivoGen, Сан-Диего, Калифорния, США) обычно культивировали в DMEM с добавлением 10% FBS, 4 mM L-глутамина, 4,5 мг/мл глюкозы, 100 Ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, 100 мкг/мл Normocin™ (InvivoGen), 30 мкг/мл бластоцидина (InvivoGen) и 100 мкг/мл зеоцина (InvivoGen) до плотности 90%. Клеточные линии культивировали при 37°C и 5% CO₂. Все реагенты были поставлены Sigma-Aldrich, Гиллингхам, Англия, Соединенное Королевство, если не указано иное.

Для совместных культур клетки, выросшие до плотности 90%, промывали один раз

фосфатно-солевым буфером (PBS - phosphate-buffered saline) (Sigma-Aldrich) и ресуспендировали в питательной среде без антибиотика при плотности 140000 клеток/мл. Супернатанты добавляли к клеткам при множественности инфицирования (MOI), эквивалентной 100:1. Положительный контроль анализа, флагеллин *Salmonella Typhimurium* (FLA-ST) (InvivoGen), использовали в концентрации 20 нг/мл. Клетки инкубировали с супернатантами при 37°C в атмосфере 5% CO₂ в течение 22 часов. Добавляли QUANTI-Blue™ (InvivoGen), планшеты инкубировали еще 2 часа и регистрировали оптическую плотность при 655 нм. Для всех штаммов были выполнены три независимых биологических повтора.

Данные на Фиг. 18 представляют три независимых повтора.

Выводы

Все протестированные супернатанты штаммов *E. gallinarum* и *E. casseliflavus* были способны эффективно активировать ответ TLR5 по сравнению с необработанным контролем. Было обнаружено, что из трех протестированных штаммов *E. casseliflavus* Тест 6 сильно активирует ответ TLR5, тогда как Тест 5 и DSM25781 вызывают менее сильные ответы TLR5.

Пример 10 - Активация NF-κB с помощью MRx518

Была исследована способность бактериального штамма MRx0518 активировать NF-κB. Результаты приведены на Фиг. 18. Супернатант MRx0518 был самым сильным активатором NF-κB. Активация NF-κB была устранена после обработки трипсином.

Эти данные демонстрируют, что флагеллин из рода *Enterococcus* и, в частности, из MRx0518 вызывает очень сильный ответ NF-κB, и поэтому может быть полезен в терапии.

Пример 11 - Дифференцировка Т-клеток

Способность MRx0518 индуцировать дифференцировку Т-клеток была исследована *in vitro* на моноклеарных клетках периферической крови (МКПК) (PBMC, Stemcell, Кат.:70025).

Методология

МКПК помещали в 96-луночные планшеты с анти-CD3 (Ebioscience, моноклональные антитела к CD3 (клон ОКТ3), функционального класса, Кат. № 16-0037-81) в количестве 400000/лунку в 50 мкл среды cRPMI на лунку (cRPMI содержит RPMI 1640 (+L-Glut, 21875-034) 2 mM конечной конц. Исходный раствор 200 mM.; 10% HI FBS (Gibco Life Technologies, 10082-147); 50 мкМ меркаптоэтанол (Gibco Life Technologies, 21985-023); и 1% пен/стреп (pen/strep) (P4333, 10 мг/мл). Затем в каждую лунку добавляли супернатант MRx518, 4000000 в 100 мкл/лунку. Супернатанты пропускали через фильтр 0,22 мкМ и соответствующим образом разбавляли при совместном культивировании.

Через 3 дня в инкубаторе при 37°C клетки удаляли и повторно суспендировали в среде, содержащей РМА- (Sigma, Кат. №P8139), иономицин (Sigma, Кат. № I3909) и GolgiSTOP (BD, Кат. № 554724) в течение 5 часов. Исходный раствор РМА составлял 1 мг/мл в DMSO, который затем разбавляли до 100 мкг/мл (для каждого образца требовалось 50 нг/мл в cRPMI), исходный раствор иономицина был 1 mM в DMSO (использовали 1 мкМ

в cRPMI) и концентрацию GolgiStop использовали при 4 мкл/6 мл.

Затем клетки подвергали окрашиванию методом проточной цитометрии:

После промывания клетки инкубировали с фиксируемым красителем Viobility 405/520 от Miltenyi biotec (1 мкл/образец) + блок Fc человека, кат. 564219 (1 мкл/образец) в PBS в течение 10 минут в темноте при комнатной температуре. Затем поверхностные антитела (по 2 мкл каждого) добавляли непосредственно в лунки на 10 минут в темноте при комнатной температуре - CD3-APC-Vio 770 (Miltenyi, кат. № 130-113-136), CD4-VioBlue (Miltenyi, кат. № 130-114-534) и CD25-VioBright FITC (Miltenyi, кат. № 130-113-283). Затем клетки дважды промывали PBS и центрифугировали при 300 g/5 мин/КТ.

Затем использовали буфер для окрашивания фактора транскрипции eBioscience FoxP3 для фиксации и пермеабиллизации клеток (кат. № 00-5523). В соответствии с протоколом eBioscience был приготовлен буфер для перманентной/фиксированной концентрации с использованием 1x концентрата и 3 разбавителя. Клетки фиксировали в течение 1 часа при КТ, а затем промывали 2x в 1x перманентной промывке и центрифугировали при 300 g/5 мин/КТ. Следующие антитела для внутриклеточного окрашивания или к фактору транскрипции добавляли к образцам в перманентной промывке (1x) в течение 45 мин/темнота/КТ или в холодильнике в течение ночи (до 18 часов) с последующей 2x промывкой антителами, используя перманентную промывку (300 мкл) и повторно суспендировали в PBS (250 мкл) для сбора на цитометре:

Внутриклеточные маркеры	Факторы транскрипции
2 мкл ИЛ10-PE	5,5 мкл FoxP3-PE-Cy7
2 мкл ИФН γ -PE Vio770	9 мкл Tbet-APC
10 мкл ИЛ17a-APC	9 мкл RoRyt-PE

Антитела человека против ИФН γ -PE Vio770 (Miltenyi, кат. № 130-114-025)

Антитела человека против ИЛ10-PE (Miltenyi, кат. № 130-112-728)

Антитела человека против ИЛ17a-APC (Miltenyi, кат. № 130-099-202)

Антитела человека против RoRyt-PE (Miltenyi, кат. № 130-103-837)

Антитела человека против Tbet-APC (Miltenyi, кат. № 130-098-655)

Моноклональные антитела Foxp3 (236A/E7), Pe cy7 (ebioscience) Кат. № 25-4777-41

Выводы

Как видно на Фиг. 19, супернатант MRx518 (SP 518) может индуцировать дифференцировку Т-хелперных клеток и цитотоксических Т-клеток.

Пример 12 - Получение инсерционного мутанта гена флагеллина *E. gallinarum* MRx0518

Этот пример относится к альтернативной стратегии инактивации гена флагеллина по сравнению с примером 5. Ген *fliC* был разрушен в результате гомологичной вставки «суицидной» плазмиды pORI19 (см. Фиг. 20). Вставка pORI19 в ген *fliC* была подтверждена секвенированием ДНК, и неподвижный фенотип полученного мутантного штамма был подтвержден *in vitro*.

Методология

Инсерционный мутант флагеллина был создан с использованием нерепликативной плазмиды pORI19 (Emr^r *repA*- Ori⁺; вектор клонирования []). Внутренний фрагмент гена *E. gallinarum* MRx0518 *fliC* был амплифицирован с использованием праймеров DC020 (SEQ ID NO: 43: CCCGGGGGATCCGCGGTAAATGTTGCTAAAGCATCATCG) и DC021 (SEQ ID NO: 44: ACGACGGTCGACCCACAGCATCTTAGGGCGTATGCG) и клонирован в pORI19. Рестрикционные ферменты и Quick Ligase (New England Biolabs, Ипсвич, Массачусетс, США) использовали в соответствии с инструкциями производителя. Эту конструкцию размножали в *E. coli* EC101 путем химической трансформации [118] и выделяли с помощью набора Genopure Plasmid Maxi Kit (Roche Diagnostics, Базель, Швейцария) из 500-мл культуры. Изолированную плазмидную ДНК концентрировали с использованием 0,3 М ацетата натрия, pH 5,2, и этанола до 20 мкл.

Электрокомпетентные клетки были успешно созданы путем выращивания бактериальных культур при субингибирующих концентрациях глицина с последующей обработкой мутанолизином и лизоцимом для дальнейшего ослабления пептидогликанового слоя клеточной стенки. Был разработан протокол для подготовки электрокомпетентных клеток *E. gallinarum* MRx0518, который был адаптирован из ранее опубликованного способа []. Вкратце, *E. gallinarum* MRx0518 выращивали в течение 18 часов в питательной среде GM17 с добавлением 0,5 М сахарозы и 3% (мас./об.) глицина (Sigma-Aldrich). Затем клетки дважды промывали 0,5 М сахарозой и 10% (об./об.) глицерином и обрабатывали 10 мкг/мл лизоцима и 10 ед./мл мутанолизина (Sigma-Aldrich) в течение 30 мин при 37 °С. Затем клетки *E. gallinarum* MRx0518 трансформировали электропорацией 10 мкг плазмидной ДНК и выделяли в питательной среде ВНИ перед посевом на селективный агар ВНИ. Положительные колонии проверяли на наличие гена *em* с использованием праймеров DC047 (SEQ ID NO:45: CCAAATTAAAGAGGGTTATAATGAACGAG) и DC048 (SEQ ID NO:46: GATGCAGTTTATGCATCCCTTAAC). Вставка плазмиды была подтверждена для успешных трансформантов с помощью ПЦР-амплификации и секвенирования (GATC Biotech, Констанц, Германия) с использованием праймеров DC013 (SEQ ID NO:47: CCGATAAATAGTAGCAGAGGGAAACC) и DC014 (SEQ ID NO:48: GGCTGAATATCCATCAGAGCTTCCTC).

Подвижность инсерционного мутанта флагеллина *in vitro* оценивали с использованием среды для тестирования подвижности BBL™ с добавлением 0,005% (мас./об.) 2,3,5-трифенилтетразолийхлорида (BD, Sparks, Мэриленд, США). Вкратце, свежую колонию инокулировали в 20 мл уравновешенной среды и инкубировали в течение 48 часов при 37°C в анаэробных условиях. Все анализы были выполнены в трех повторностях.

Последовательности

SEQ ID NO:1 - Полипептид флагеллина из *Enterococcus gallinarum* MRx0518

SEQ ID NO:2 - Полипептид флагеллина из *Enterococcus gallinarum* DSM100110

SEQ ID NO:3 - Полипептид флагеллина из *Enterococcus gallinarum* MRx0554

SEQ ID NO:4 - Полипептид флагеллина из *Enterococcus gallinarum* MRx0556
 SEQ ID NO:5 - Полипептид флагеллина из *Enterococcus gallinarum* MRx1548
 SEQ ID NO:6 - Полипептид флагеллина из *Enterococcus gallinarum* MRx1650
 SEQ ID NO:7 - Полипептид флагеллина из *Enterococcus gallinarum* MRx1763
 SEQ ID NO:8 - Полипептид флагеллина из *Enterococcus gallinarum* MRx1766
 SEQ ID NO:9 - Полипептид флагеллина из *Enterococcus gallinarum* MRx1775
 SEQ ID NO:10 - Полипептид флагеллина из *Enterococcus gallinarum* MRx1886
 SEQ ID NO:11 - Полипептид флагеллина из *Enterococcus gallinarum* 2A8
 SEQ ID NO:12 - Полипептид флагеллина из *Enterococcus gallinarum* 9402
 SEQ ID NO:13 - Полипептид флагеллина из *Enterococcus gallinarum* A6981
 SEQ ID NO:14 - Полипептид флагеллина из *Enterococcus gallinarum* MRx1649
 SEQ ID NO:15 - Полипептид флагеллина из *Enterococcus gallinarum* EG2
 SEQ ID NO:16 - Полипептид флагеллина из *Enterococcus gallinarum* SKF1
 SEQ ID NO:17 - Полипептид флагеллина из *Enterococcus gallinarum* DSM 7370
 SEQ ID NO:18 - Полипептид флагеллина из *Enterococcus gallinarum* 1a6A
 SEQ ID NO:19 - Полипептид флагеллина из *Enterococcus gallinarum* 3h10B
 SEQ ID NO:20 - Полипептид флагеллина из *Enterococcus gallinarum* 14-MB-W-14
 SEQ ID NO:21 - Полипептид флагеллина из *Enterococcus gallinarum* ATCC12755
 SEQ ID NO:22 - Полипептид флагеллина из *Enterococcus gallinarum* DSM4841
 SEQ ID NO:23 - Полипептид флагеллина из *Enterococcus gallinarum* DSM20680
 SEQ ID NO:24 - Полипептид флагеллина из *Enterococcus gallinarum* EC10
 SEQ ID NO:25 - Полипептид флагеллина из *Enterococcus gallinarum* EC20
 SEQ ID NO:26 - Полипептид флагеллина из *Enterococcus gallinarum* EC30
 SEQ ID NO:27 - Полипептид флагеллина из *Enterococcus gallinarum* F1129
 SEQ ID NO:28 - Полипептид флагеллина из *Enterococcus gallinarum* F1129F 46
 SEQ ID NO:29 - Полипептид флагеллина из *Enterococcus gallinarum* NBRC 100478
 SEQ ID NO:30 - Полипептид флагеллина из *Enterococcus gallinarum* PAVET15
 SEQ ID NO:31 - Полипептид флагеллина из *Enterococcus gallinarum* NLAE-zl-G268
 SEQ ID NO:32 - Полипептид флагеллина из *Enterococcus gallinarum* NLAE-zl-C414
 SEQ ID NO:33 - Полипептид флагеллина из *Enterococcus gallinarum* FDAARGOS-

163

SEQ ID NO:34 - Полипептид флагеллина из *Enterococcus gallinarum* MRx0858
 SEQ ID NO:35 - Полипептид флагеллина из *Enterococcus gallinarum* DSM25781
 SEQ ID NO:36 - Полипептид флагеллина из *Enterococcus gallinarum* DSM28564
 SEQ ID NO:37 - Полипептид флагеллина из *Enterococcus gallinarum* DSM28565
 SEQ ID NO:38 - Полипептид флагеллина из *Enterococcus gallinarum* F1213F 228
 SEQ ID NO:39 - Полипептид флагеллина из *Enterococcus gallinarum* DSM20718
 SEQ ID NO:40 - Полипептид флагеллина из *Enterococcus gallinarum* DSM20628
 SEQ ID NO:41 - Полипептид флагеллина из *Enterococcus gallinarum* NBRC100675
 SEQ ID NO:42 - Полипептид флагеллина из *Enterococcus gallinarum* DSM24841

REFERENCES

- [1] Spor *et al.* (2011) *Nat Rev Microbiol.* 9(4):279-90.
- [2] Eckburg *et al.* (2005) *Science.* 10;308(5728):1635-8.
- [3] Macpherson *et al.* (2001) *Microbes Infect.* 3(12):1021-35
- [4] Macpherson *et al.* (2002) *Cell Mol Life Sci.* 59(12):2088-96.
- [5] Mazmanian *et al.* (2005) *Cell* 15;122(1):107-18.
- [6] Chung & Kasper (2010) *Curr. Opin. Immunol.* 22: 455-460
- [7] Macpherson (2006) *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 308: 1 17-136.
- [8] Gaboriau-Routhiau *et al.* (2009) *Immunity.* 31: 677-689.
- [9] Ivanov *et al.* (2009) *Cell* 139: 485-498
- [10] Geuking *et al.* (2011) *Immunity* 34(5):794-806
- [11] Atarashi *et al.* (2011) *Science*, 331, 6015, 337-341.
- [12] Nutsch & Hsieh, (2012) *Current opinion in immunology*, 24, 4, 385-391.
- [13] Prakash *et al.* (2011) *Cell host & microbe*, 10, 3, 273-284.
- [14] Sczesnak *et al.* (2011) *Cell host & microbe*, 10, 3, 260-272.
- [15] Hajam *et al.* (2017) *Experimental & Molecular Medicine* 49, e373;
- [16] WO2012/097012
- [17] Zheng *et al.* (2017) *Science Translational Medicine* 9
- [18] WO2008/144889
- [19] Frank *et al.* (2007) *PNAS* 104(34):13780-5.
- [20] Scanlan *et al.* (2006) *J Clin Microbiol.* 44(11):3980-8.
- [21] Kang *et al.* (2010) *Inflamm Bowel Dis.* 16(12):2034-42.
- [22] Machiels *et al.* (2013) *Gut.* 63(8):1275-83.
- [23] WO 2013/050792
- [24] WO 03/046580
- [25] WO 2013/008039
- [26] WO 2014/167338
- [27] Goldin and Gorbach (2008) *Clin Infect Dis.* 46 Suppl 2:S96-100.
- [28] Azad *et al.* (2013) *BMJ.* 347:f6471.
- [29] Strickertsson *et al.* (2014) *Genes* 5(3): 726-738.
- [30] Lu *et al.* (2015). Функциональные свойства флагеллина как стимулятора врожденного иммунитета. *Nat Publ Gr.*
- [31] Yonekura *et al.* (2003) *Nature* 424, 643-650.
- [32] Jacchieri *et al.* (2003) *J Bacteriol* 185, 4243-7.
- [33] Smith *et al.* (2003) *Nat Immunol* 4, 1247-1253.
- [34] Yoon *et al.* (2013). *NIH Public Access* 335, 859-864.
- [35] Beatson *et al.* (2006). *Trends Microbiol* 14, 151-155.
- [36] She *et al.* (2015) *Anal. Chem.*, 87 (8), pp 4218-4224
- [37] Song *et al.* (2017) *Sci Rep.* 7: 40878
- [38] Kelly *et al.* (2015) *Nature Protocols* 10, 845-858

- [39] Pettersen EF *et al.* (2004), *J Comput Chem* 25(13):1605-12.
- [40] Sun *et al.* (2013) *J Bacteriol.* 195(11):2550-61.
- [41] Attmannspacher *et al.* (2008) *Mol Microbiol* 68, 328-341.
- [42] Okino *et al.* (1989) *J Bacteriol* 171, 2075-82.
- [43] Darnton and Berg (2008) *J Bacteriol* 190, 8223-4.
- [44] Kawai and Akira (2007) *Trends in Molecular Medicine* 13, 11, 460-469
- [45] Gewirtz *et al.* (2011) *Journal of Immunology* 167, 1882-1885
- [46] Uematsu, S. *et al.* (2006) *Nature Immunology* 7, 868-874
- [47] Steiner (2007). *Infection and Immunity* 75, 545-552
- [48] Cai *et al.* (2011) *Cancer Res.* 71(7): 2466-2475
- [49] Zheng *et al.* (2017) *Sci Transl Med.* 8;9(376).
- [50] WO2017/085520
- [51] Rhee *et al* (2008) *Gastroenterology*, 135, 2, 518-528.e3
- [52] Melo *et al.* (2015) *Immunology and Cell Biology* 93, 86-98
- [53] Cai *et al.* (2011) *Cancer Res.* 71(7): 2466-2475
- [54] Bohnhorst *et al.* (2006) *Leukemia*, 20, 1138-1144
- [55] Okamoto *et al.* (2009) *British Journal of Haematology*, 147, 582-590
- [56] Rakoff-Nahoum *et al* (2009) *Nat Rev Cancer* 9: 57-63.
- [57] Leigh *et al.* (2013) *PLOSone* 9, 1, e85587
- [58] Brackett *et al.* (2016) *PNAS* E874-E883
- [59] Sfondrini *et al.* (2006) *J Immunol* 176 (11) 6624-6630
- [60] Haabeth *et al.* (2012) *OncolImmunology* 1(1):1146-1152.
- [61] Lejeune *et al.* (2006) *Cancer Immun.* 6:6
- [62] Pace *et al.* (1983) *PNAS.* 80:8782-6.
- [63] Sgadari *et al.* (1996) *PNAS.* 93:13791-6.
- [64] Arenberg *et al.* (1996) *J. Exp. Med.* 184:981-92.
- [65] Sgadari *et al.* (1997) *Blood.* 89:2635-43.
- [66] Vijay-Kumar *et al.* (2008) *J Immunol*; 180:8280-8285
- [67] Toshkov *et al.* (2017) *Radiat Res.* 187(5): 570-580
- [68] Porte *et al.* (2015) *Antimicrob. Agents Chemother.* 59,10 6064-6072
- [69] Bloch *et al.* (2016) *Eur Cytokine Netw.*;27(3):63-67
- [70] Weinberger (2018) *Curr Opin Pharmacol*, 41, 34-41.
- [71] Lim (2015) *Aging Cell* 14, 907-915
- [72] Mohanty *et al.* (2015) *J Infect Dis*, 211(7) 1174-1184.
- [73] Fernandez-Ruiz *et al.*, (2015) *Vaccine* 2015 33(51)
- [74] Morel *et al.*, (2011) *Vaccine*, 29(13) 2461-2473.
- [75] Leal *et al.*, (2001) *Immunol* 103(3) 375-381
- [76] Knudsen *et al.* (2016), *Sci Reps*, 6 (19570).
- [77] Su *et al.*, (2008) *Vaccine* 26(40), 5111-22
- [78] Li *et al*, (2007) *J Immunol*, 178(8), 5271-5276

- [79] Coffman *et al.*, (2012) *Immunity* 33(4) 492-503
- [80] Olafsdottir *et al.*, *Vaccine* 33(40) 5302-5307
- [81] Didierlaurent *et al.*, *J Immunol* 2014, 193(4) 1920-1930
- [82] Park *et al.*, (2002) *J Immunol*, 169(3), 1433-1443
- [83] Berthoud *et al.* (2009) *J Immunol Methods* 340(1) 33-41
- [84] Mori *et al.* (2012), *Eur J Immunol* 42, 2709-2719
- [85] Ren and Torres (2009) *Brain Res Rev.*;60(1):57-64
- [86] Martinon *et al.* (2002) *Mol Cell.*;10(2):417-26.
- [87] Murphy *et al.* (2003) *J Exp Med.* 2003; 198(12): 1951-1957.
- [88] Chan *et al.* (2006) *J Exp Med.*; 203(12): 2577-2587.
- [89] *The Immune Response Basic and Clinical Principles*, 1st Edition (2006)
- [90] Gaur and Aggarwal (2003). *Biochem Pharmacol.*;66(8):1403-8.
- [91] Wang and Lin (2008) *Acta Pharmacol Sin.*; 29(11): 1275-1288.
- [92] Tanaka *et al.* (2014) *Cold Spring Harb Perspect Biol.*; 6(10): a016295.
- [93] Bettelli *et al.* (2006) *Nature* 441:235-238
- [94] Fraietta, *et al.* (2018) *Nat Med.* 24(5):563-571
- [95] Zhou, *et al.* (2010) *Blood* 116(14):2484-93.
- [96] Glenn and Whartenby (2014) *World J Stem Cells.*; 6(5): 526-539.
- [97] Heng *et al.* (2004) *Cardiovasc Res.* 2004 Apr 1;62(1):34-42.
- [98] Rashidi *et al.* (2018) *Biol Blood Marrow Transplant* 24, 1260-1263
- [99] Fulop *et al* (2013) *Crit Rev Oncog.* 2013;18(6):489-513.
- [100] Bektas *et al.* (2017) *J Leukoc Biol.*;102(4):977-988.
- [101] Fulop *et al* (2016) *Rev Invest Clin.*;68(2):84-91.
- [102] Fulop *et al.* (2018) *Front Immunol.*;8:1960.
- [103] WO2006/110603.
- [104] Handbook of Pharmaceutical Excipients, 2nd Edition, (1994), отредактировано A Wade and PJ Weller
- [105] Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (A. R. Gennaro edit. 1985)
- [106] US 2016/0067188
- [107] Gennaro (2000) *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*. 20я редакция, ISBN: 0683306472.
- [108] *Molecular Biology Techniques: An Intensive Laboratory Course*, (Ream *et al.*, eds., 1998, Academic Press).
- [109] *Methods In Enzymology* (S. Colowick and N. Kaplan, eds., Academic Press, Inc.)
- [110] *Handbook of Experimental Immunology*, Vols. I-IV (D.M. Weir and C.C. Blackwell, eds, 1986, Blackwell Scientific Publications)
- [111] Sambrook *et al.* (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd edition (Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- [112] *Handbook of Surface and Colloidal Chemistry* (Birdi, K.S. ed., CRC Press, 1997)

[¹¹³] Ausubel *et al.* (eds) (2002) *Short protocols in molecular biology*, 5th edition (Current Protocols).

[¹¹⁴] *PCR (Introduction to Biotechniques Series)*, 2nd ed. (Newton & Graham eds., 1997, Springer Verlag)

[¹¹⁵] *Current Protocols in Molecular Biology* (F.M. Ausubel *et al.*, eds., 1987) Supplement
30

[¹¹⁶] *Current Protocols in Molecular Biology* (F.M. Ausubel *et al.*, eds., 1987) Supplement
30

[¹¹⁷] Smith & Waterman (1981) *Adv. Appl. Math.* 2: 482-489.

[¹¹⁸] Law J *et al.* (1995) *J Bacteriol* 177:7011-7018.

[¹¹⁹] Shepard *et al.*, B. D. & Gilmore, M. S. B Electroporation and efficient transformation of *Enterococcus faecalis* grown in high concentrations of glycine in *Methods in molecular biology: Vol 47: Electroporation protocols for microorganisms Vol 47* (ed J. A. Nickoloff) 217-226 (Humana Press Inc., 1995)

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Полипептид флагеллина из рода *Enterococcus* для применения в терапии.
2. Полипептид флагеллина для применения по п. 1, отличающийся тем, что полипептид флагеллина получен из вида *Enterococcus gallinarum*.
3. Полипептид флагеллина для применения по п. 1 или п. 2, отличающийся тем, что полипептид флагеллина получен из штамма, депонированного в NCIMB под номером доступа NCIMB 42488.
4. Полипептид флагеллина для применения по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что полипептид флагеллина имеет по меньшей мере 75% 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 99,9% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1.
5. Полипептид флагеллина для применения по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что полипептид флагеллина содержит SEQ ID NO: 1.
6. Полипептид флагеллина для применения по пп. 1-3, отличающийся тем, что полипептид флагеллина имеет по меньшей мере 75% 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 99,9% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 2.
7. Полипептид флагеллина для применения по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что полипептид флагеллина содержит SEQ ID NO: 2.
8. Полипептид флагеллина для применения по любому из пп. 1-3, отличающийся тем, что полипептид флагеллина имеет по меньшей мере 75% 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 99,9% идентичности последовательности с одной из SEQ ID NO: 3-42.
9. Полипептид флагеллина для применения по п. 8, отличающийся тем, что полипептид флагеллина имеет последовательность с по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 99,9% идентичностью последовательности с одной из SEQ ID NO: 3-16.
10. Полипептид флагеллина для применения по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что полипептид флагеллина не содержит домен D3.
11. Полипептид флагеллина для применения по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что полипептид флагеллина находится в мономерной форме.
12. Полипептид флагеллина для применения по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что полипептид флагеллина содержит сайт узнавания TLR5, который по меньшей мере на 99%, 99,5% или 99,9% идентичен остаткам 87-96 и 290-295 в SEQ ID NO: 1.
13. Полипептид флагеллина для применения по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что полипептид флагеллина является частью сборки жгутиков бактерий.
14. Фрагмент полипептида флагеллина для применения в терапии, отличающийся тем, что полипептид флагеллина определен в соответствии с любым из пп. 1-12, и отличающийся тем, что фрагмент имеет длину по меньшей мере 7, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300 или 350 аминокислот.

15. Фрагмент полипептида флагеллина для применения по п. 14, отличающийся тем, что этот фрагмент имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1 и/или (ii) содержит фрагмент по меньшей мере из 7 смежных аминокислот из SEQ ID NO: 1.

16. Полипептид флагеллина для применения по любому из предыдущих пунктов, конъюгированный с антигеном, таким как антиген патогена или опухолевый антиген.

17. Слитый полипептид, содержащий полипептид флагеллина для применения в терапии, отличающийся тем, что полипептид флагеллина определен по любому из пп. 1-15.

18. Слитый полипептид по п. 17, который содержит антиген, такой как антиген патогена или опухолевый антиген.

19. Полипептид, содержащий один или один или более из следующих участков аминокислот SEQ ID NO: 1: 2-32, 87-96, 165-272, 234-358, 290-295, или содержащий последовательность с по меньшей мере 90%, 92%, 95%, 98% или 99% идентичностью последовательности с одним из указанных фрагментов.

20. Полипептид по п. 19, отличающийся тем, что полипептид имеет 90%, 92%, 95%, 98% или 99% идентичности последовательности с последовательностью аминокислот 165-272 в SEQ ID NO: 1.

21. Полипептид по п. 19, отличающийся тем, что полипептид имеет 90%, 92%, 95%, 98% или 99% идентичности последовательности с последовательностью аминокислот 87-96, 165-272 и 290-295 в SEQ ID NO: 1.

22. Полипептид по пп. 19-21, который дополнительно содержит иммуностимулирующий участок.

23. Полипептид по п. 22, отличающийся тем, что иммуностимулирующий участок представляет собой активирующий участок TLR4 или TLR5.

24. Полипептид по пп. 19-23, отличающийся тем, что полипептид представляет собой полипептид флагеллина.

25. Полипептид флагеллина для применения по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что полипептид является частью сборки жгутиков бактерий.

26. Полипептид по п. 25, отличающийся тем, что полипептид представляет собой полипептид флагеллина.

27. Полипептид для применения по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что полипептид дополнительно содержит один или более антигенов.

28. Полинуклеотидная последовательность, кодирующая полипептид флагеллина из рода *Enterococcus*, для применения в терапии.

29. Полинуклеотидная последовательность для применения по п. 28, отличающаяся тем, что полипептид флагеллина определен по любому из пп. 2-27.

30. Полинуклеотидная последовательность для применения по п. 29, отличающийся тем, что кодируемая полипептидная последовательность имеет по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 99,9% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1, или является SEQ ID NO: 1.

31. Клетка-хозяин, экспрессирующая рекомбинантный полипептид флагеллина из рода *Enterococcus*, для применения в терапии.

32. Клетка-хозяин, содержащая рекомбинантную полинуклеотидную последовательность, которая кодирует полипептид флагеллина из рода *Enterococcus*, для применения в терапии.

33. Клетка-хозяин для применения по п. 31 и п. 32, отличающаяся тем, что полипептид флагеллина определен по любому из пп. 2-27.

34. Вектор или плазида, содержащие полинуклеотидную последовательность по пп. 28-30.

35. Клетка-хозяин, содержащая вектор или плазмиду по п. 34.

36. Клетка-хозяин по п. 35, которая дополнительно экспрессирует гетерологичный антиген, такой как антиген патогена или опухолевый антиген.

37. Композиция, содержащая полипептид флагеллина по любому из пп. 1-13, фрагмент полипептида флагеллина по п. 14 или п. 15, слитый полипептид по п. 17 или п. 18, полипептид по пп. 19-27, полинуклеотид по пп. 27-29, клетку-хозяин по любому из пп. 31-33 и п. 35 или вектор по п. 34, для применения в терапии.

38. Композиция для применения по п. 37 для применения в способе лечения или профилактики рака.

39. Композиция для применения по п. 38, отличающаяся тем, что композиция предназначена для лечения иммуногенных опухолей.

40. Композиция для применения по п. 38 или п. 39, отличающаяся тем, что композиция предназначена для применения в способе лечения или профилактики рака легкого, рака молочной железы, рака печени или рака толстой кишки.

41. Композиция для применения по любому из пп. 37-40, отличающаяся тем, что композиция предназначена для применения в способе уменьшения размера опухоли, уменьшения роста опухоли, предотвращения метастазирования или предотвращения ангиогенеза.

42. Композиция для применения по п. 37 для применения для стимулирования иммунной системы у субъекта.

43. Композиция для применения по п. 37, предназначенная для применения при лечении, предотвращении или задержке старения иммунной системы.

44. Композиция для применения по п. 37 для применения в качестве адъюванта вакцины.

45. Композиция для применения по п. 37 для применения в усилении клеточной терапии, такой как CAR-T.

46. Композиция для применения по любому из пп. 37-44, отличающаяся тем, что композиция увеличивает уровень и/или активность NF-κB.

47. Композиция для применения по любому из пп. 37-46, отличающаяся тем, что композиция предназначена для перорального введения.

48. Композиция для применения по любому из пп. 37-46, отличающаяся тем, что

композиция содержит один или более фармацевтически приемлемых эксципиентов или носителей.

49. Способ лечения заболевания, включающий введение композиции, содержащей полипептид флагеллина из бактериального штамма рода *Enterococcus*, пациенту, нуждающемуся в этом.

50. Способ лечения или профилактики рака, включающий введение композиции, содержащей полипептид флагеллина из бактериального штамма рода *Enterococcus*, пациенту, нуждающемуся в этом.

51. Способ лечения или профилактики заболевания или патологического состояния, связанного со сниженной иммуностимуляцией, включающий введение полипептида флагеллина из бактериального штамма рода *Enterococcus* пациенту, нуждающемуся в этом.

По доверенности

ИЗМЕНЕННАЯ ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ ПО СТАТЬЕ 34 РСТ (ДЛЯ СВЕДЕНИЙ)

1. Полипептид флагеллина из рода *Enterococcus* для применения в терапии.
2. Полипептид флагеллина для применения по п. 1, отличающийся тем, что полипептид флагеллина получен из вида *Enterococcus gallinarum*.
3. Полипептид флагеллина для применения по п. 1 или п. 2, отличающийся тем, что полипептид флагеллина получен из штамма, депонированного в NCIMB под номером доступа NCIMB 42488.
4. Полипептид флагеллина для применения по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что полипептид флагеллина имеет по меньшей мере 75% 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 99,9% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1.
5. Полипептид флагеллина для применения по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что полипептид флагеллина содержит SEQ ID NO: 1.
6. Полипептид флагеллина для применения по пп. 1-3, отличающийся тем, что полипептид флагеллина имеет по меньшей мере 75% 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 99,9% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 2.
7. Полипептид флагеллина для применения по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что полипептид флагеллина содержит SEQ ID NO: 2.
8. Полипептид флагеллина для применения по любому из пп. 1-3, отличающийся тем, что полипептид флагеллина имеет по меньшей мере 75% 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 99,9% идентичности последовательности с одной из SEQ ID NO: 3-42.
9. Полипептид флагеллина для применения по п. 8, отличающийся тем, что полипептид флагеллина имеет последовательность с по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 99,9% идентичностью последовательности с одной из SEQ ID NO: 3-16.
10. Полипептид флагеллина для применения по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что полипептид флагеллина не содержит домен D3.
11. Полипептид флагеллина для применения по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что полипептид флагеллина находится в мономерной форме.
12. Полипептид флагеллина для применения по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что полипептид флагеллина содержит сайт узнавания TLR5, который по меньшей мере на 99%, 99,5% или 99,9% идентичен остаткам 87-96 и 290-295 в SEQ ID NO: 1.
13. Полипептид флагеллина для применения по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что полипептид флагеллина является частью сборки жгутиков бактерий.
14. Фрагмент полипептида флагеллина для применения в терапии, отличающийся тем, что полипептид флагеллина определен в соответствии с любым из пп. 1-12, и отличающийся тем, что фрагмент имеет длину по меньшей мере 7, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70,

80, 90, 100, 150, 200, 250, 300 или 350 аминокислот.

15. Фрагмент полипептида флагеллина для применения по п. 14, отличающийся тем, что этот фрагмент имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1 и/или (ii) содержит фрагмент по меньшей мере из 7 смежных аминокислот из SEQ ID NO: 1.

16. Полипептид флагеллина для применения по любому из предыдущих пунктов, конъюгированный с антигеном, таким как антиген патогена или опухолевый антиген.

17. Слитый полипептид, содержащий полипептид флагеллина для применения в терапии, отличающийся тем, что полипептид флагеллина определен по любому из пп. 1-15.

18. Слитый полипептид по п. 17, который содержит антиген, такой как антиген патогена или опухолевый антиген.

19. Полипептид, содержащий один или один или более из следующих участков аминокислот SEQ ID NO: 1: 2-32, 87-96, 165-272, 234-358, 290-295, или содержащий последовательность с по меньшей мере 90%, 92%, 95%, 98% или 99% идентичностью последовательности с одним из указанных фрагментов.

20. Полипептид по п. 19, отличающийся тем, что полипептид имеет 90%, 92%, 95%, 98% или 99% идентичности последовательности с последовательностью аминокислот 165-272 в SEQ ID NO: 1.

21. Полипептид по п. 19, отличающийся тем, что полипептид имеет 90%, 92%, 95%, 98% или 99% идентичности последовательности с последовательностью аминокислот 87-96, 165-272 и 290-295 в SEQ ID NO: 1.

22. Полипептид по пп. 19-21, который дополнительно содержит иммуностимулирующий участок.

23. Полипептид по п. 22, отличающийся тем, что иммуностимулирующий участок представляет собой активирующий участок TLR4 или TLR5.

24. Полипептид по пп. 19-23, отличающийся тем, что полипептид представляет собой полипептид флагеллина.

25. Полипептид флагеллина для применения по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что полипептид является частью сборки жгутиков бактерий.

26. Полипептид по п. 25, отличающийся тем, что полипептид представляет собой полипептид флагеллина.

27. Полипептид для применения по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что полипептид дополнительно содержит один или более антигенов.

28. Полинуклеотидная последовательность, кодирующая полипептид флагеллина из рода *Enterococcus*, для применения в терапии.

29. Полинуклеотидная последовательность для применения по п. 28, отличающаяся тем, что полипептид флагеллина определен по любому из пп. 2-27.

30. Полинуклеотидная последовательность для применения по п. 29, отличающийся тем, что кодируемая полипептидная последовательность имеет по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 99,9% идентичности последовательности

с SEQ ID NO: 1, или является SEQ ID NO: 1.

31. Клетка-хозяин, экспрессирующая рекомбинантный полипептид флагеллина из рода *Enterococcus*, для применения в терапии.

32. Клетка-хозяин, содержащая рекомбинантную полинуклеотидную последовательность, которая кодирует полипептид флагеллина из рода *Enterococcus*, для применения в терапии.

33. Клетка-хозяин для применения по п. 31 и п. 32, отличающаяся тем, что полипептид флагеллина определен по любому из пп. 2-27.

34. Вектор или плазида, содержащие полинуклеотидную последовательность по пп. 28-30.

35. Клетка-хозяин, содержащая вектор или плазмиду по п. 34.

36. Клетка-хозяин по п. 35, которая дополнительно экспрессирует гетерологичный антиген, такой как антиген патогена или опухолевый антиген.

37. Композиция, содержащая полипептид флагеллина по любому из пп. 1-13, фрагмент полипептида флагеллина по п. 14 или п. 15, слитый полипептид по п. 17 или п. 18, полипептид по пп. 19-27, полинуклеотид по пп. 27-29, клетку-хозяин по любому из пп. 31-33 и п. 35 или вектор по п. 34, для применения в терапии.

38. Композиция для применения по п. 37 для применения в способе лечения или профилактики рака.

39. Композиция для применения по п. 38, отличающаяся тем, что композиция предназначена для лечения иммуногенных опухолей.

40. Композиция для применения по п. 38 или п. 39, отличающаяся тем, что композиция предназначена для применения в способе лечения или профилактики рака легкого, рака молочной железы, рака печени или рака толстой кишки.

41. Композиция для применения по любому из пп. 37-40, отличающаяся тем, что композиция предназначена для применения в способе уменьшения размера опухоли, уменьшения роста опухоли, предотвращения метастазирования или предотвращения ангиогенеза.

42. Композиция для применения по п. 37 для применения для стимулирования иммунной системы у субъекта.

43. Композиция для применения по п. 37, предназначенная для применения при лечении, предотвращении или задержке старения иммунной системы.

44. Композиция для применения по п. 37 для применения в качестве адъюванта вакцины.

45. Композиция для применения по п. 37 для применения в усилении клеточной терапии, такой как CAR-T.

46. Композиция для применения по любому из пп. 37-44, отличающаяся тем, что композиция увеличивает уровень и/или активность NF-κB.

47. Композиция для применения по любому из пп. 37-46, отличающаяся тем, что композиция предназначена для перорального введения.

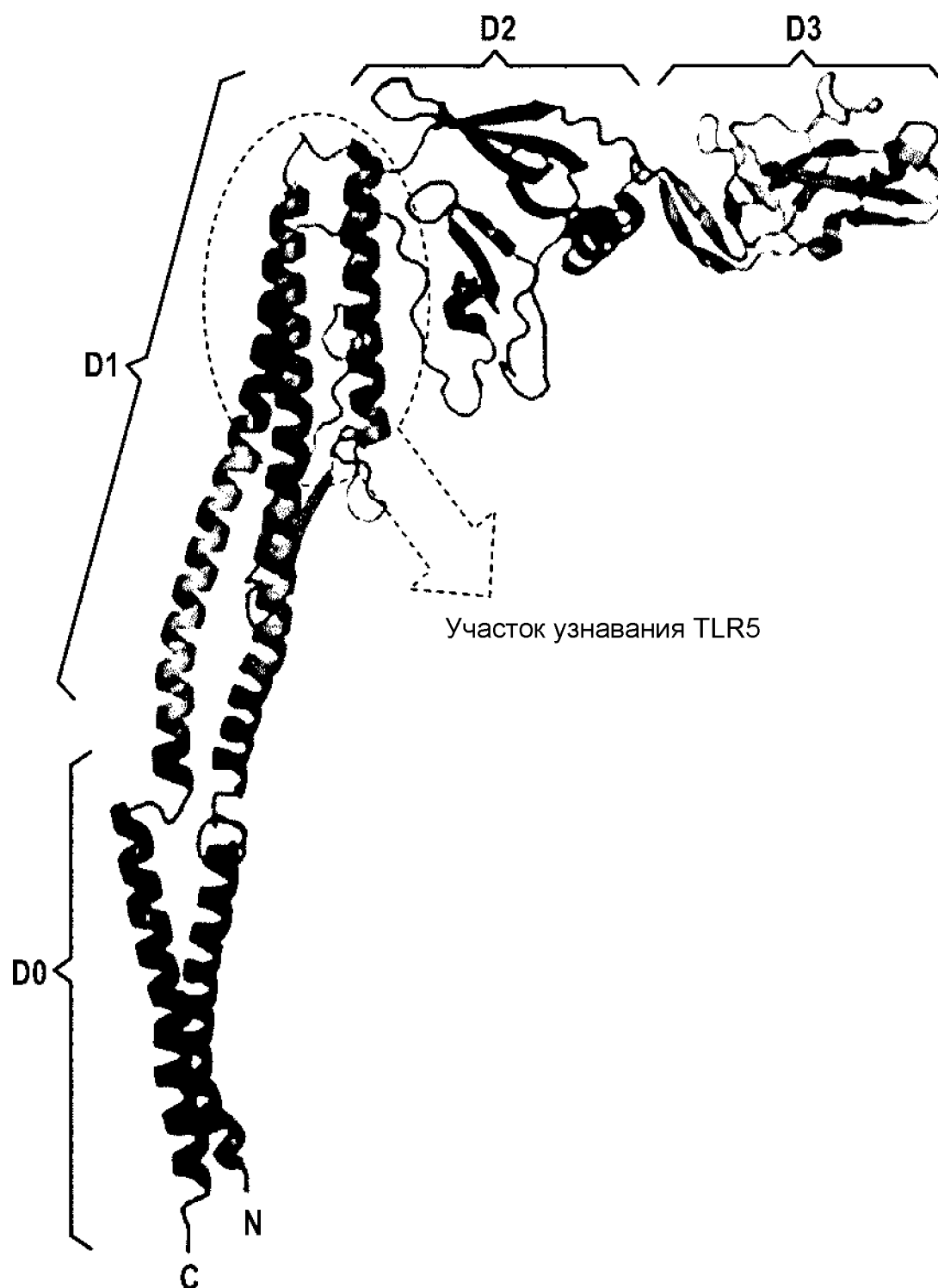
48. Композиция для применения по любому из пп. 37-46, отличающаяся тем, что композиция содержит один или более фармацевтически приемлемых эксципиентов или носителей.

49. Способ лечения заболевания, включающий введение композиции, содержащей полипептид флагеллина из бактериального штамма рода *Enterococcus*, пациенту, нуждающемуся в этом.

По доверенности

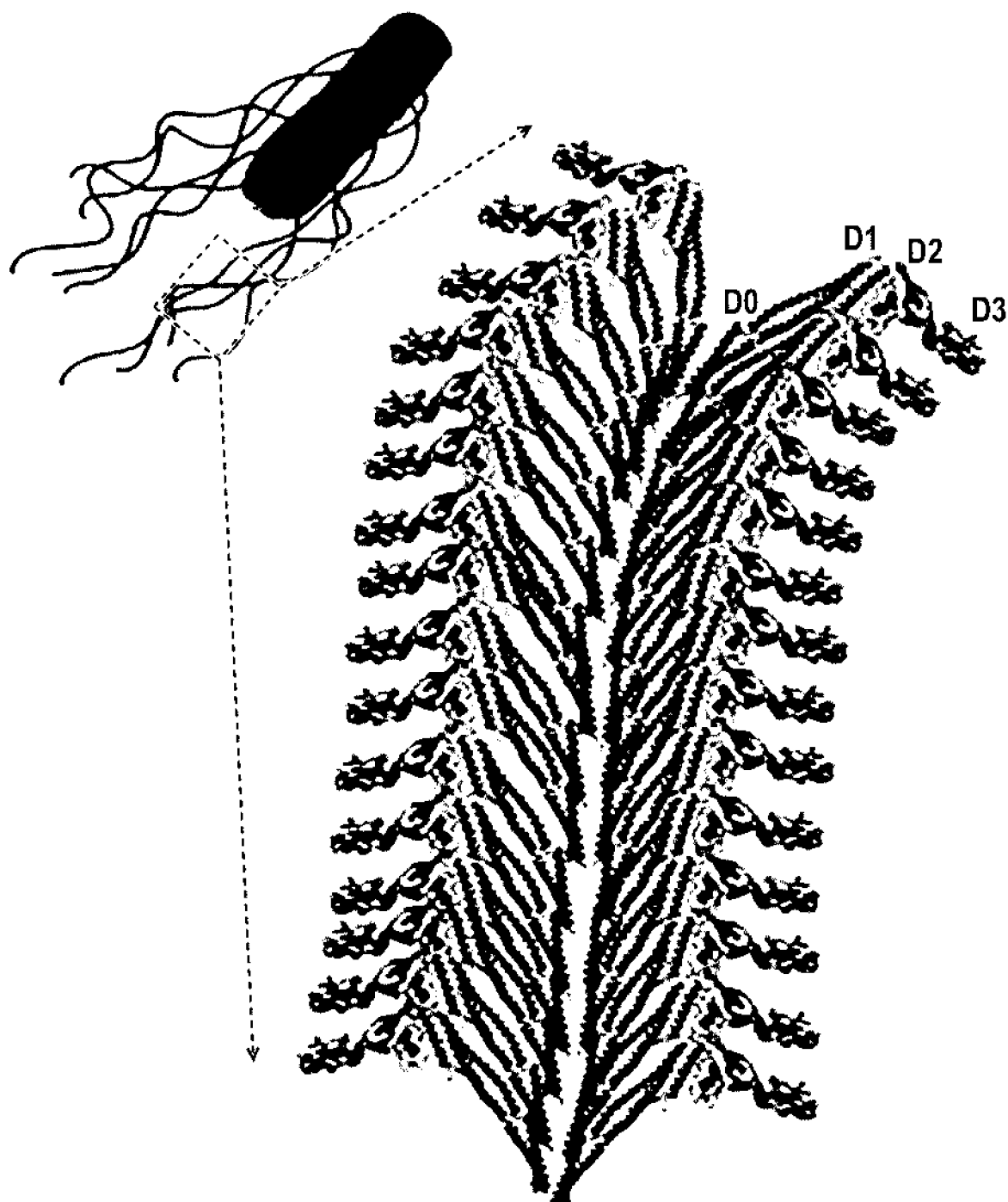
ФИГ. 1(i)

Флагеллин



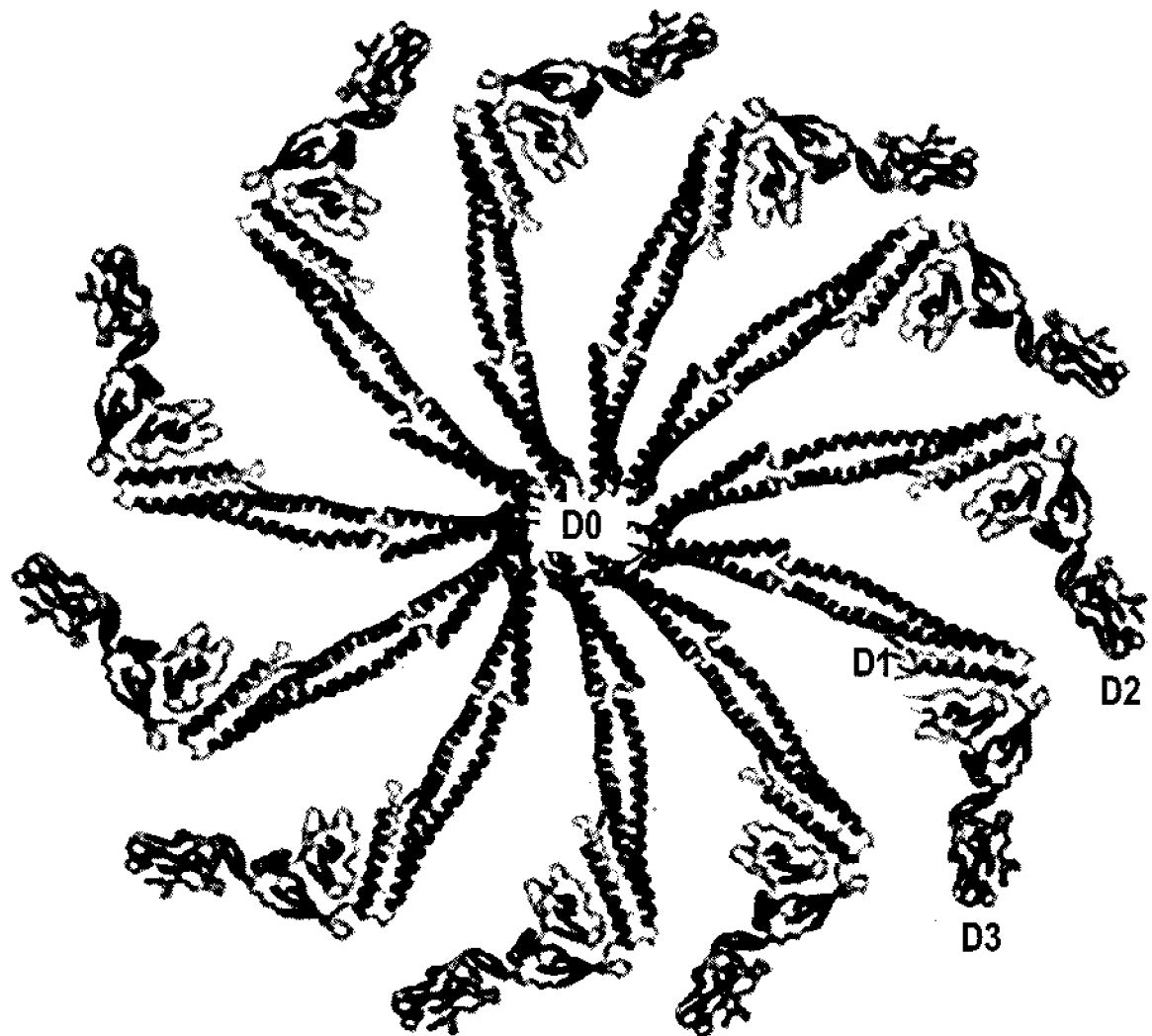
ФИГ. 1(ii)

Поперечный срез филамента жгутика



ФИГ. 1(iii)

Вид сверху филамента жгутика



ФИГ. 2(i)

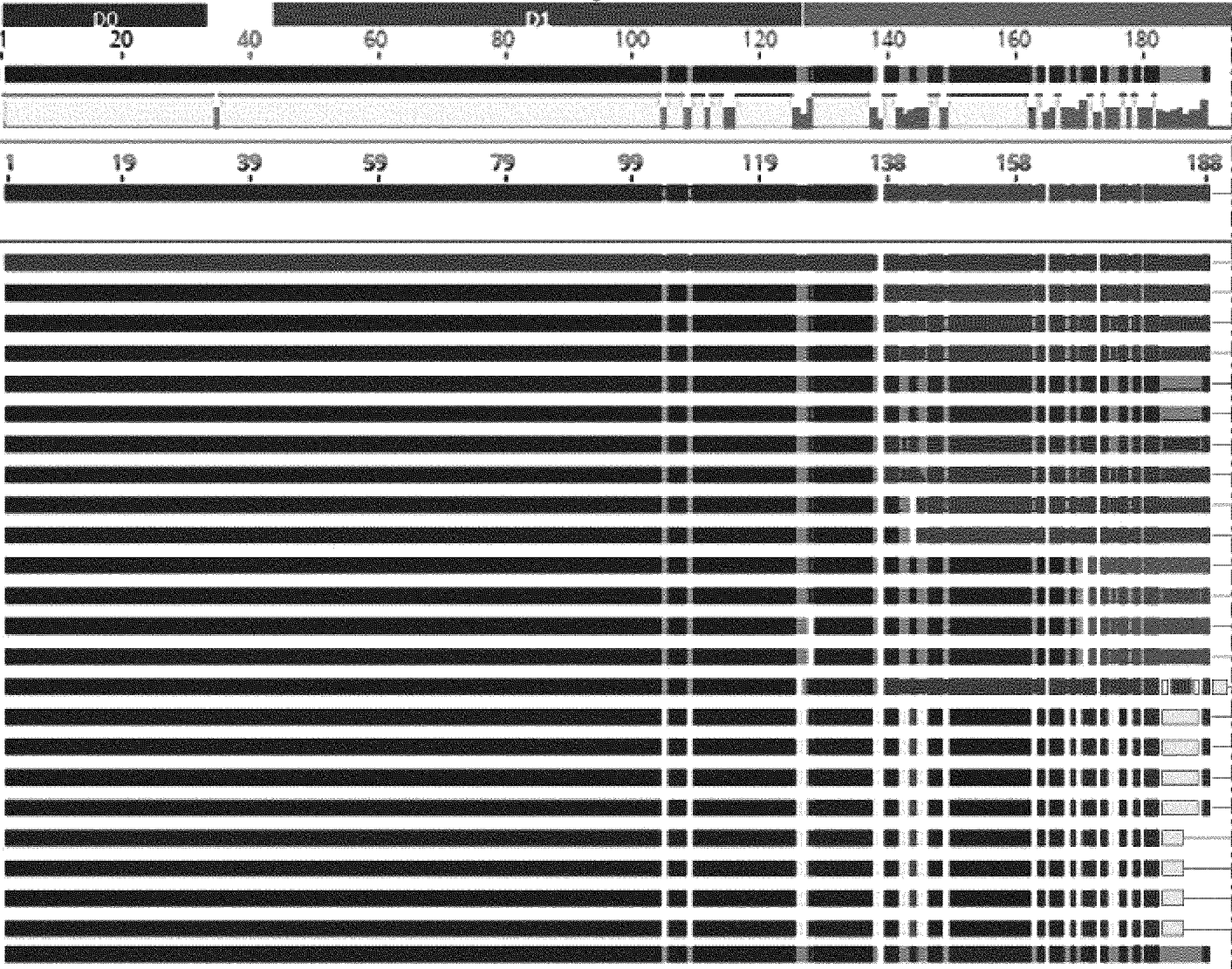
Предсказанные сайты связывания TLR5 (на основе *Salmonella typhimurium*)

TLR5*
87-96

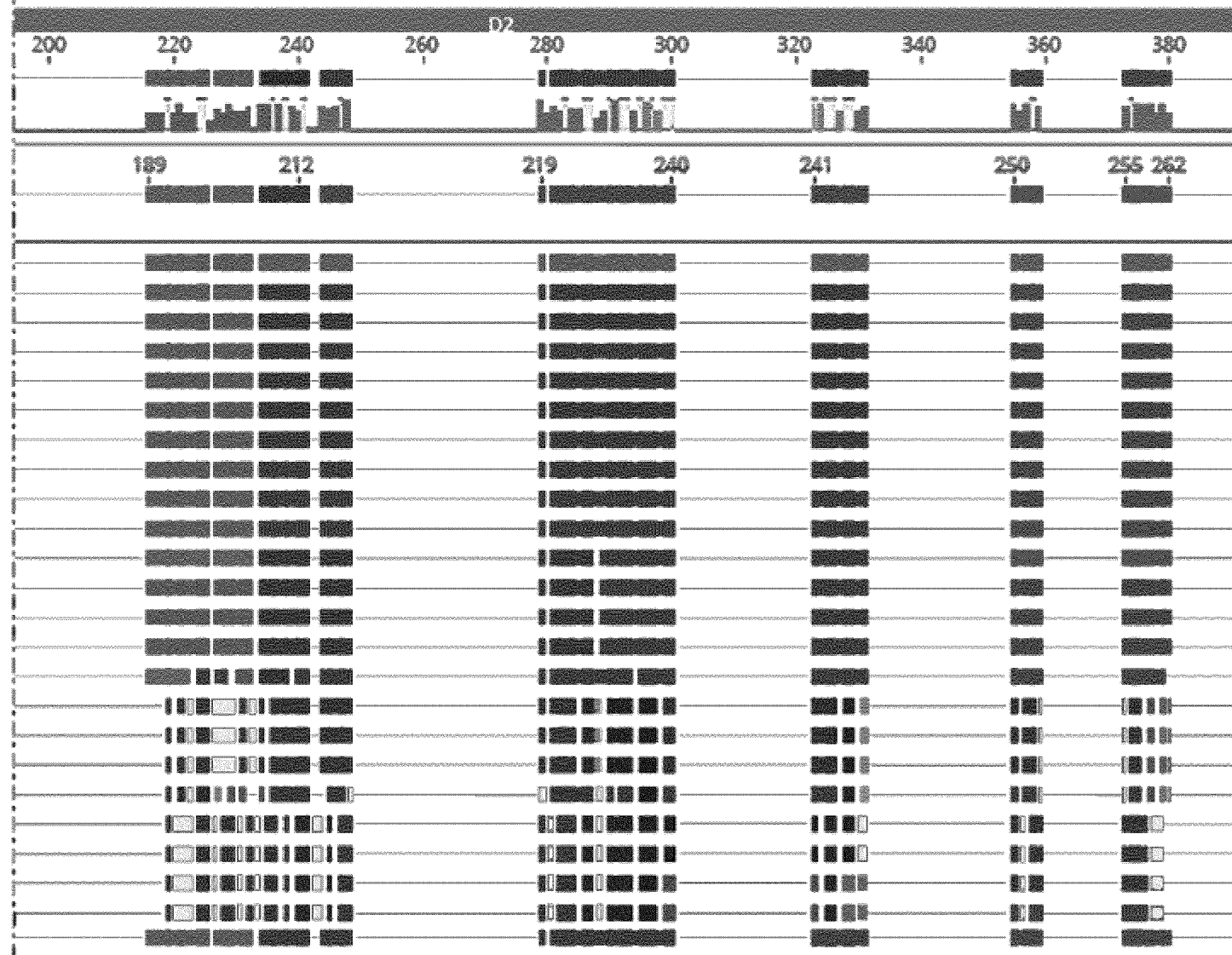
Консенсус
Идентичность

1. Egal MRx0518

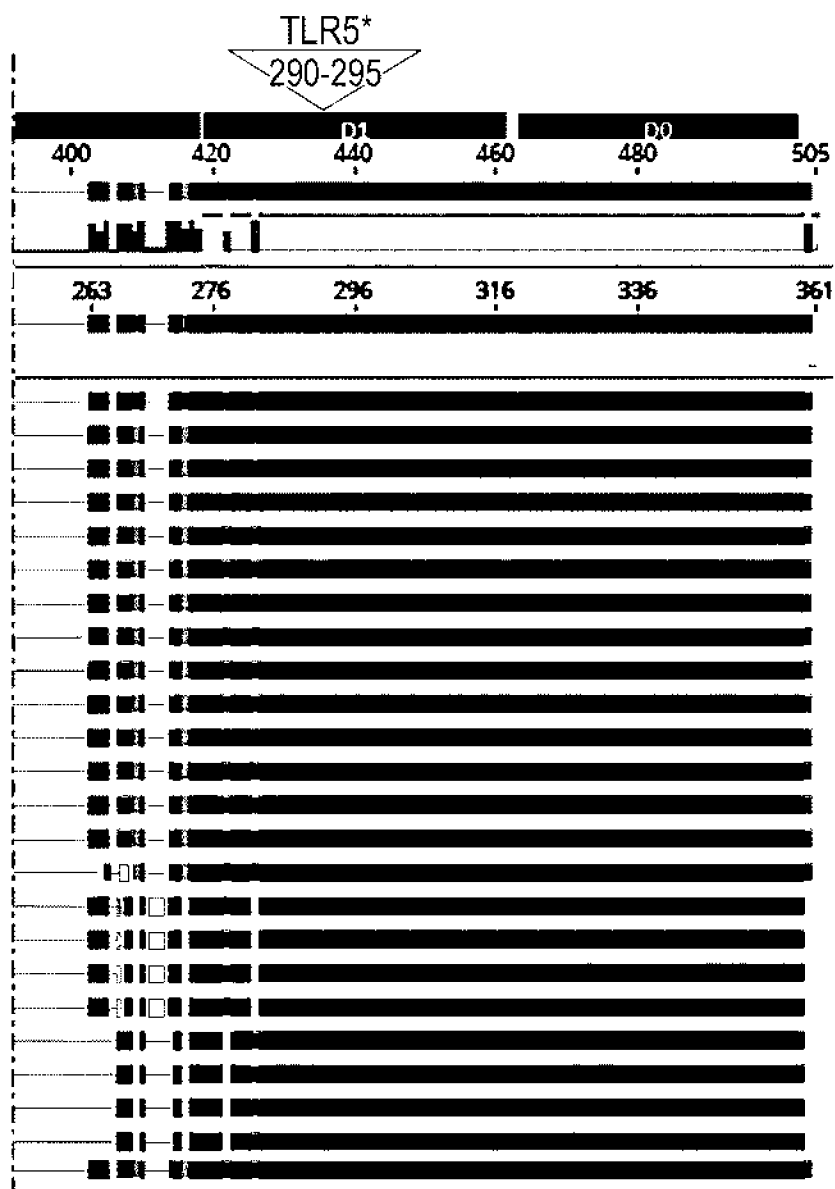
- 2. Egal MRx0554
- 3. Egal MRx0556
- 4. E. gal MRx1548
- 5. E. gal MRx1650
- 6. E. gal MRx1763
- 7. E. gal MRx1766
- 8. E. gal MRx1775
- 9. E. gal MRx1886
- 10. Egal 2A8
- 11. E. gal 9402
- 12. Egal A6981
- 13. E. gal MRx1649
- 14. Egal EG2
- 15. Egal SKF1
- 16. Egal FDAARGOS-163
- 17. E. gal DSM28564
- 18. E. gal DSM28565
- 19. Egal DSM100110
- 20. Egal F1213F 228
- 21. E. gal DSM20718
- 22. E. gal DSM20628
- 23. Egal NBRC100675
- 24. Egal DSM24841
- 25. S. typhimurium



ФИГ. 2(ii)



ФИГ. 2(iii)



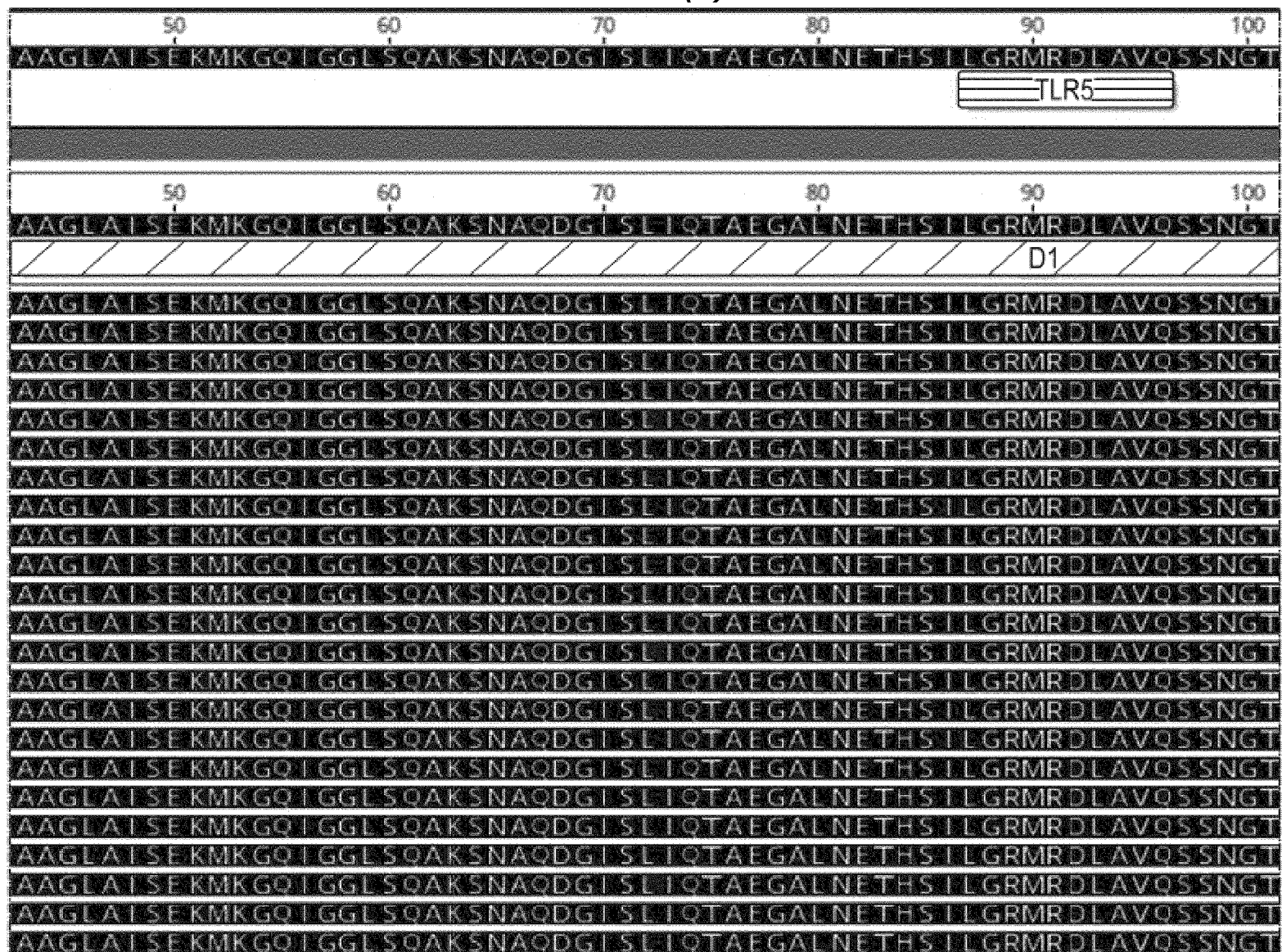
ФИГ. 3

ФИГ. 3(i)	ФИГ. 3(ii)	ФИГ. 3(iii)
ФИГ. 3(iv)	ФИГ. 3(v)	ФИГ. 3(vi)
ФИГ. 3(vii)	ФИГ. 3(viii)	
ФИГ. 3(ix)		

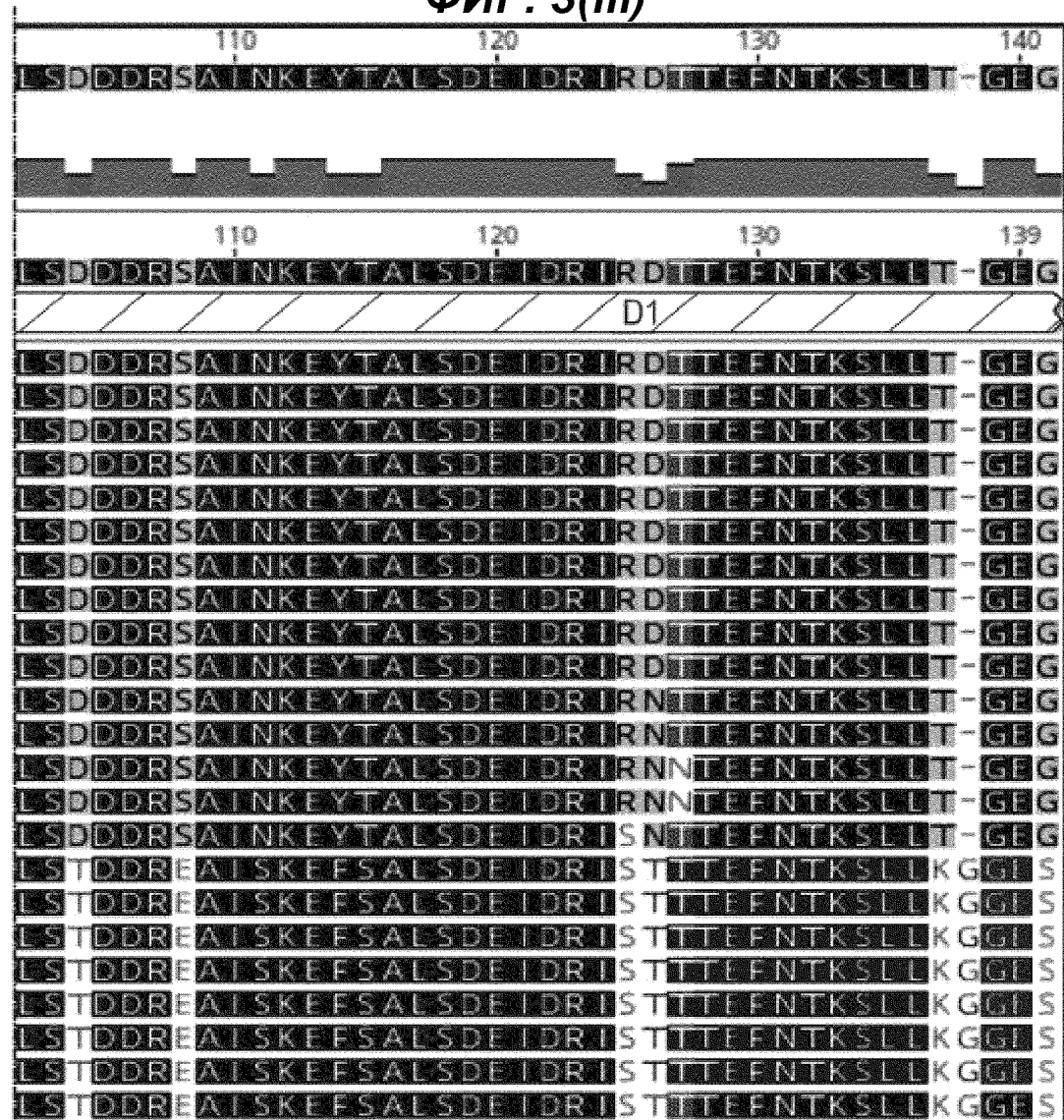
ФИГ. 3(i)

Консенсус	1 10 20 30 40 MRINTNVSA LNTYSRLTAANASKSNSLSKLSSGLRINKAGDD
Идентичность	
1. E. gal MRx0518	1 10 20 30 40 MRINTNVSA LNTYSRLTAANASKSNSLSKLSSGLRINKAGDD
2. E. gal MRx0554	MRINTNVSA LNTYSRLTAANASKSNSLSKLSSGLRINKAGDD
3. E. gal MRx0556	MRINTNVSA LNTYSRLTAANASKSNSLSKLSSGLRINKAGDD
4. E. gal MRx1548	MRINTNVSA LNTYSRLTAANASKSNSLSKLSSGLRINKAGDD
5. E. gal MRx1650	MRINTNVSA LNTYSRLTAANASKSNSLSKLSSGLRINKAGDD
6. E. gal MRx1763	MRINTNVSA LNTYSRLTAANASKSNSLSKLSSGLRINKAGDD
7. E. gal MRx1766	MRINTNVSA LNTYSRLTAANASKSNSLSKLSSGLRINKAGDD
8. E. gal MRx1775	MRINTNVSA LNTYSRLTAANASKSNSLSKLSSGLRINKAGDD
9. E. gal MRx1886	MRINTNVSA LNTYSRLTAANASKSNSLSKLSSGLRINKAGDD
10. Egal 2A8	MRINTNVSA LNTYSRLTAANASKSNSLSKLSSGLRINKAGDD
11. E. gal 9402	MRINTNVSA LNTYSRLTAANASKSNSLSKLSSGLRINKAGDD
12. Egal A6981	MRINTNVSA LNTYSRLTAANASKSNSLSKLSSGLRINKAGDD
13. E. gal MRx1649	MRINTNVSA LNTYSRLTAANASKSNSLSKLSSGLRINKAGDD
14. Egal EG2	MRINTNVSA LNTYSRLTAANASKSNSLSKLSSGLRINKAGDD
15. Egal SKF1	MRINTNVSA LNTYSRLTAANASKSNSLSKLSSGLRINKAGDD
16. Egal FDAARGOS-163	MRINTNVSA LNTYSRLTAANASKSNSLSKLSSGLRINKAGDD
17. E. gal DSM28564	MRINTNVSA LNTYSRLTAANASKSNSLSKLSSGMRINKAGDD
18. E. gal DSM28565	MRINTNVSA LNTYSRLTAANASKSNSLSKLSSGMRINKAGDD
19. E. gal DSM100110	MRINTNVSA LNTYSRLTAANASKSNSLSKLSSGMRINKAGDD
20. Egal F1213F 228	MRINTNVSA LNTYSRLTAANASKSNSLSKLSSGMRINKAGDD
21. E. gal DSM20718	MRINTNVSA LNTYSRLTAANASKSNSLSKLSSGMRINKAGDD
22. E. gal DSM20628	MRINTNVSA LNTYSRLTAANASKSNSLSKLSSGMRINKAGDD
23. Egal NBRC100675	MRINTNVSA LNTYSRLTAANASKSNSLSKLSSGMRINKAGDD
24. Egal DSM24841	MRINTNVSA LNTYSRLTAANASKSNSLSKLSSGMRINKAGDD

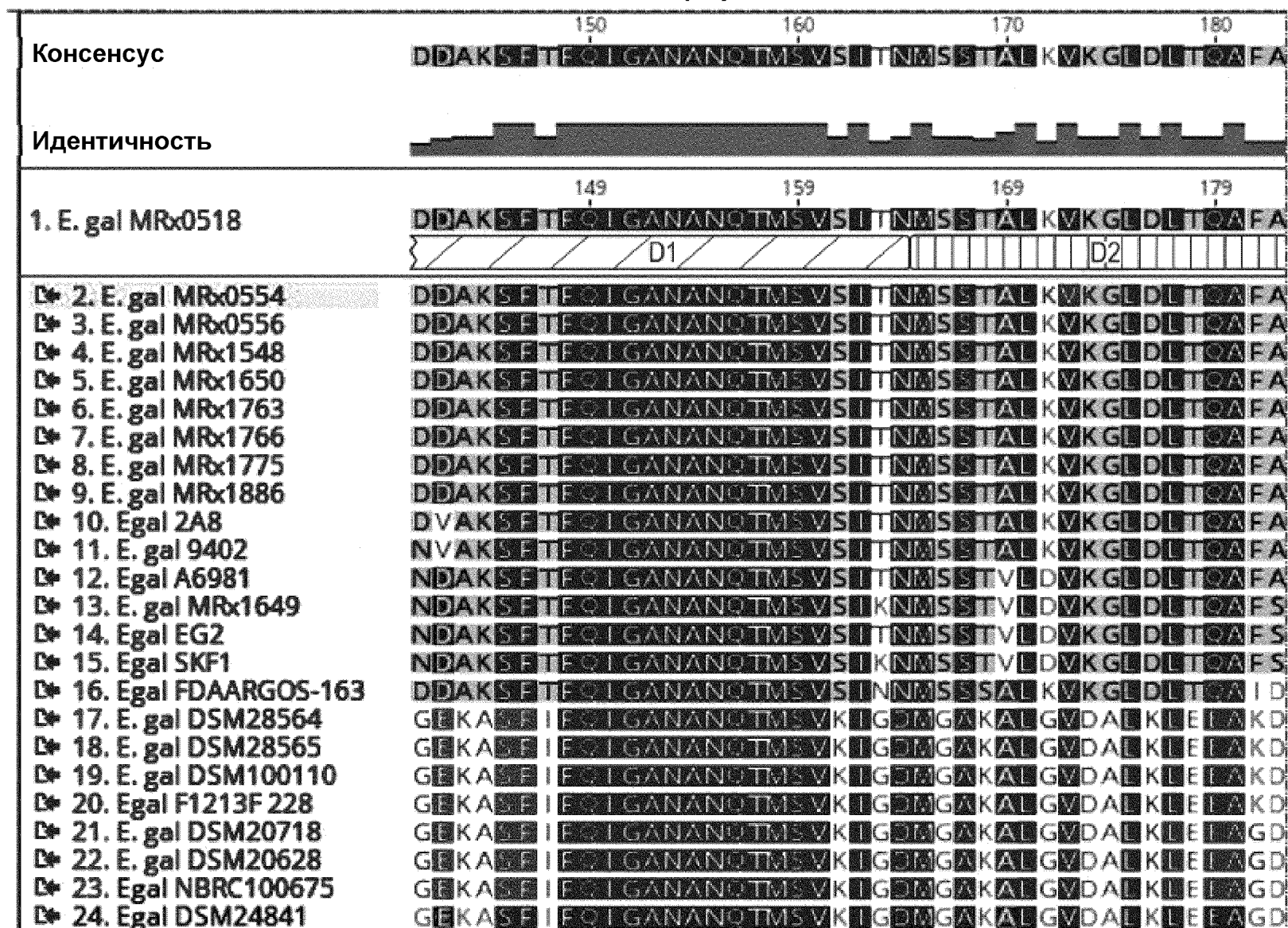
ФИГ. 3(ii)



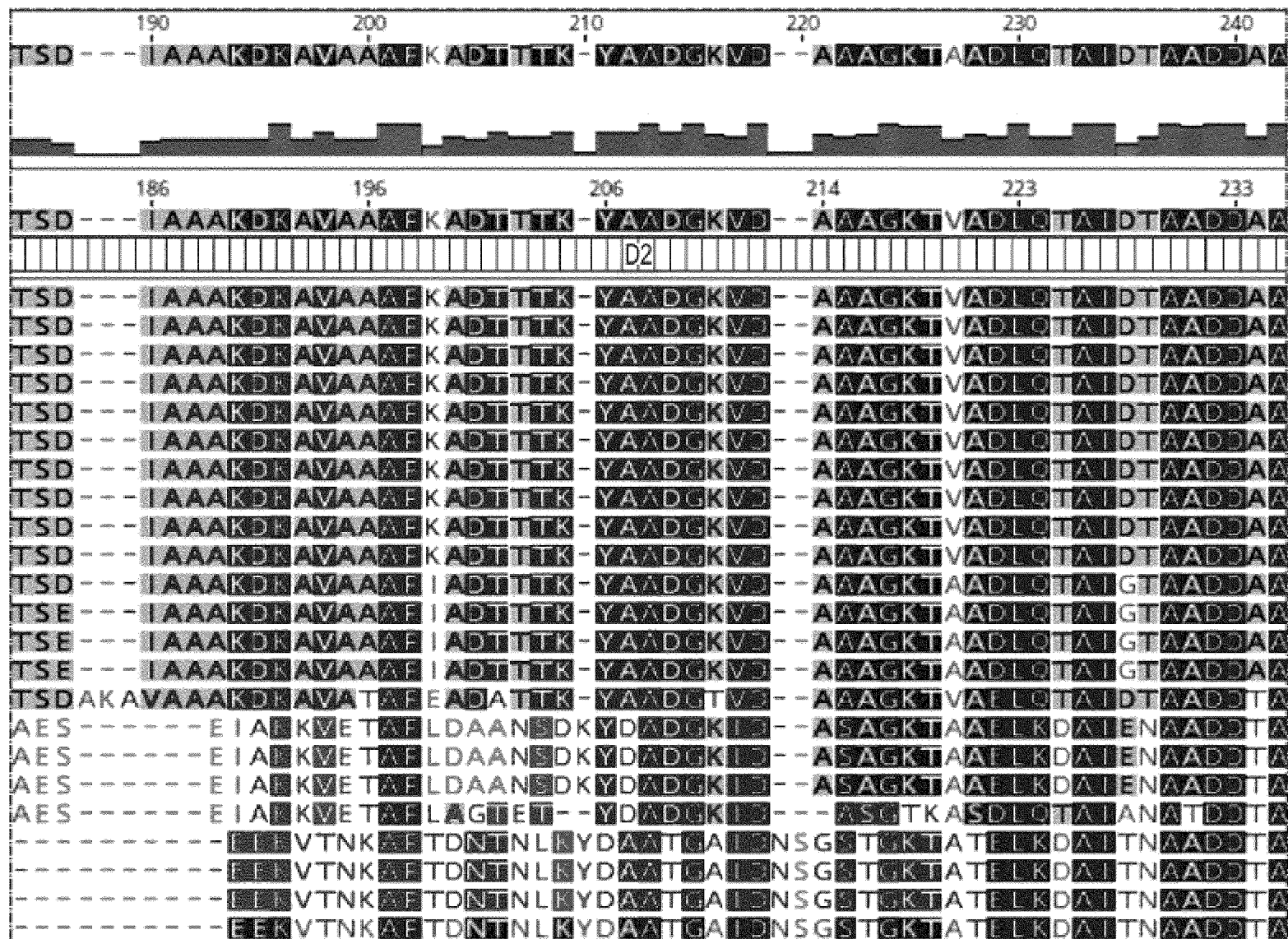
ФИГ. 3(iii)



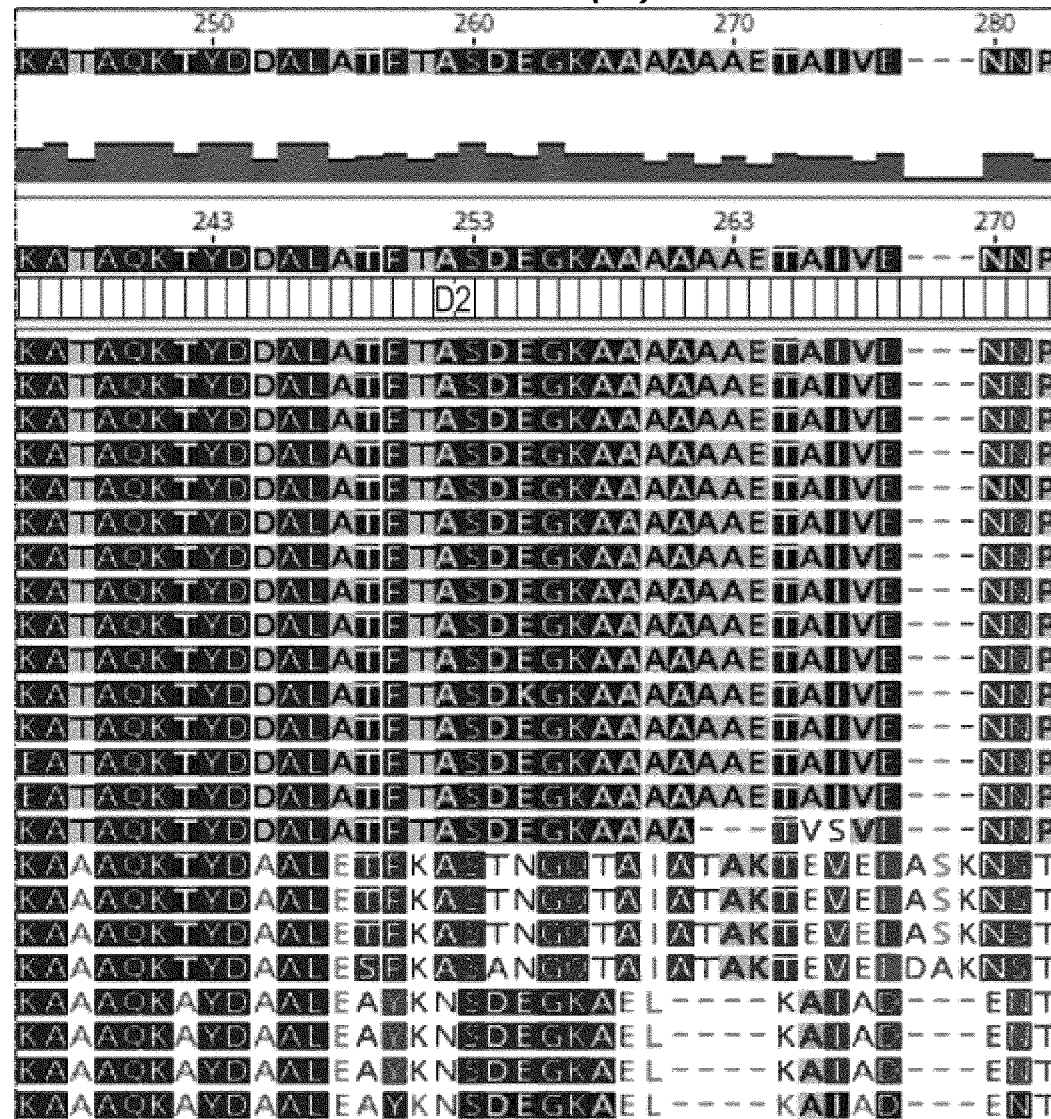
ФИГ. 3(iv)



ФИГ. 3(v)



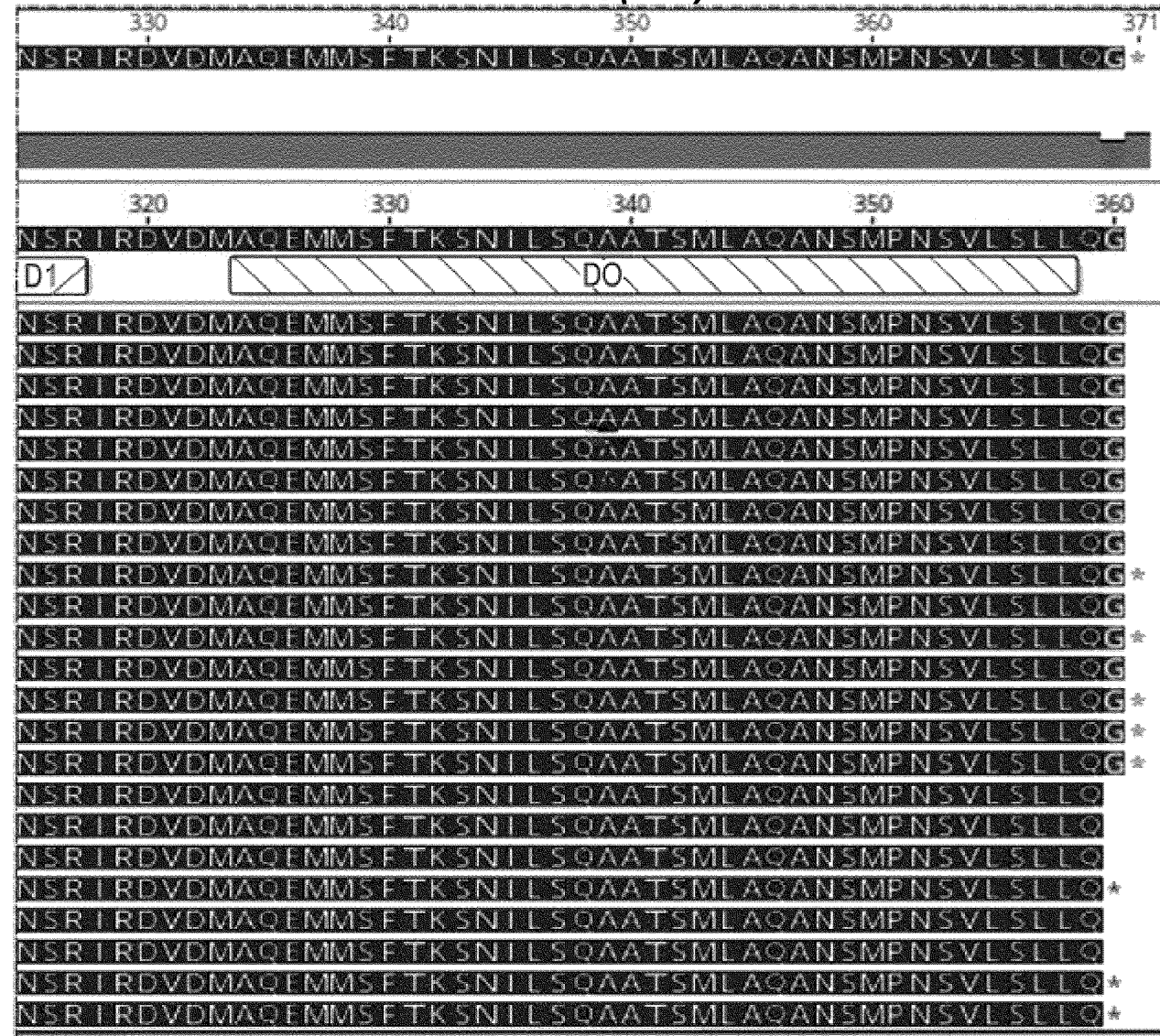
ФИГ. 3(vi)



ФИГ. 3(vii)

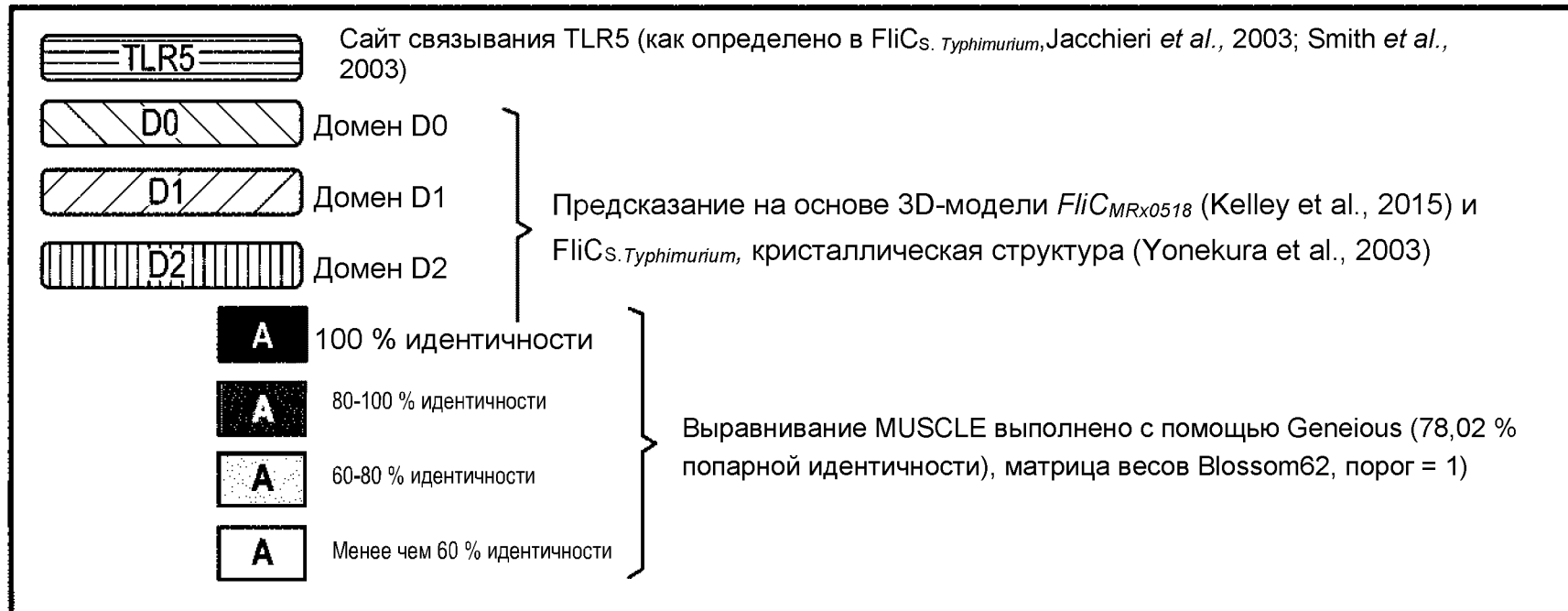
Консенсус	290300310320 ITKIDKAIKAVSAQRADLGAAQNRLEHTINNLTGTTQENLSEA TLR5
Идентичность	280290300310 ITKIDKAIKAVSAQRADLGAAQNRLEHTINNLTGTTQENLSEA D1
1. E. gal MRx0518	280290300310 ITKIDKAIKAVSAQRADLGAAQNRLEHTINNLTGTTQENLSEA D1
☛ 2. E. gal MRx0554	ITKIDKAIKAVSAQRADLGAAQNRLEHTINNLTGTTQENLSEA
☛ 3. E. gal MRx0556	ITKIDKAIKAVSAQRADLGAAQNRLEHTINNLTGTTQENLSEA
☛ 4. E. gal MRx1548	ITKIDKAIKAVSAQRADLGAAQNRLEHTINNLTGTTQENLSEA
☛ 5. E. gal MRx1650	ITKIDKAIKAVSAQRADLGAAQNRLEHTINNLTGTTQENLSEA
☛ 6. E. gal MRx1763	ITKIDKAIKAVSAQRADLGAAQNRLEHTINNLTGTTQENLSEA
☛ 7. E. gal MRx1766	ITKIDKAIKAVSAQRADLGAAQNRLEHTINNLTGTTQENLSEA
☛ 8. E. gal MRx1775	ITKIDKAIKAVSAQRADLGAAQNRLEHTINNLTGTTQENLSEA
☛ 9. E. gal MRx1886	ITKIDKAIKAVSAQRADLGAAQNRLEHTINNLTGTTQENLSEA
☛ 10. Egal 2A8	ITKIDKAIKAVSAQRADLGAAQNRLEHTINNLTGTTQENLSEA
☛ 11. E. gal 9402	ITKIDKAIKAVSAQRADLGAAQNRLEHTINNLTGTTQENLSEA
☛ 12. Egal A6981	ITKIDKAIKAVSAQRADLGAAQNRLEHTINNLTGTTQENLSEA
☛ 13. E. gal MRx1649	ITKIDKAIKAVSAQRADLGAAQNRLEHTINNLTGTTQENLSEA
☛ 14. Egal EG2	ITKIDKAIKAVSAQRADLGAAQNRLEHTINNLTGTTQENLSEA
☛ 15. Egal SKF1	ITKIDKAIKAVSAQRADLGAAQNRLEHTINNLTGTTQENLSEA
☛ 16. Egal FDAARGOS-163	ITKIDKAIKAVSAQRADLGAAQNRLEHTINNLTGTTQENLSEA
☛ 17. E. gal DSM28564	VSKIDEAIAKTIVSAQRADLGAAQNRLEHTINNLTGTTQENLSEA
☛ 18. E. gal DSM28565	VSKIDEAIAKTIVSAQRADLGAAQNRLEHTINNLTGTTQENLSEA
☛ 19. E. gal DSM100110	VSKIDEAIAKTIVSAQRADLGAAQNRLEHTINNLTGTTQENLSEA
☛ 20. Egal F1213F 228	VSKIDEAIAKTIVSAQRADLGAAQNRLEHTINNLTGTTQENLSEA
☛ 21. E. gal DSM20718	ISKIDNNAIKAVSAQRADLGAAQNRLEHTINNLTGTTQENLSEA
☛ 22. E. gal DSM20628	ISKIDNNAIKAVSAQRADLGAAQNRLEHTINNLTGTTQENLSEA
☛ 23. Egal NBRC100675	ISKIDNNAIKAVSAQRADLGAAQNRLEHTINNLTGTTQENLSEA
☛ 24. Egal DSM24841	ISKIDNNAIKAVSAQRADLGAAQNRLEHTINNLTGTTQENLSEA

ФИГ. 3(viii)



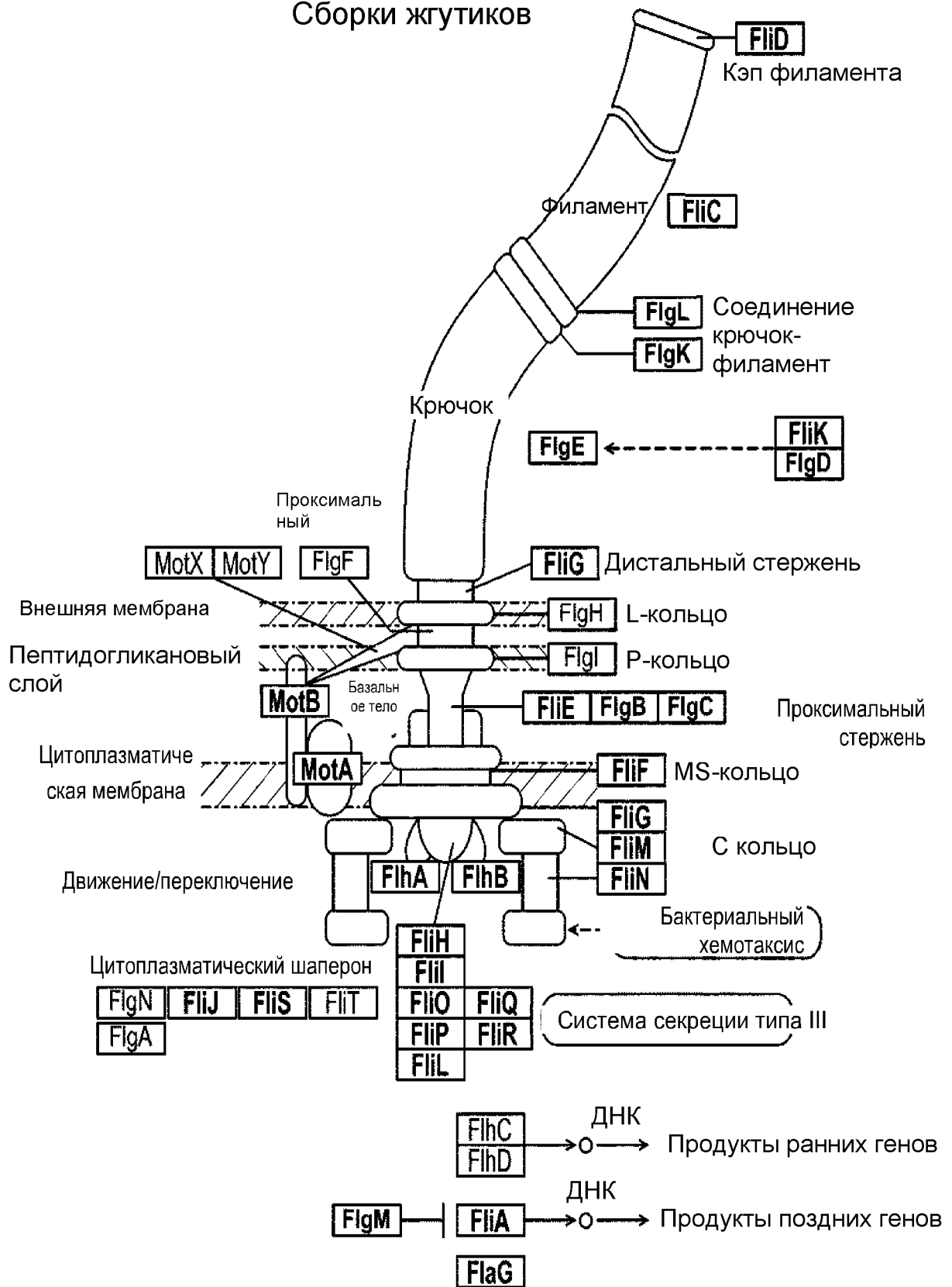
ФИГ. 3(ix)

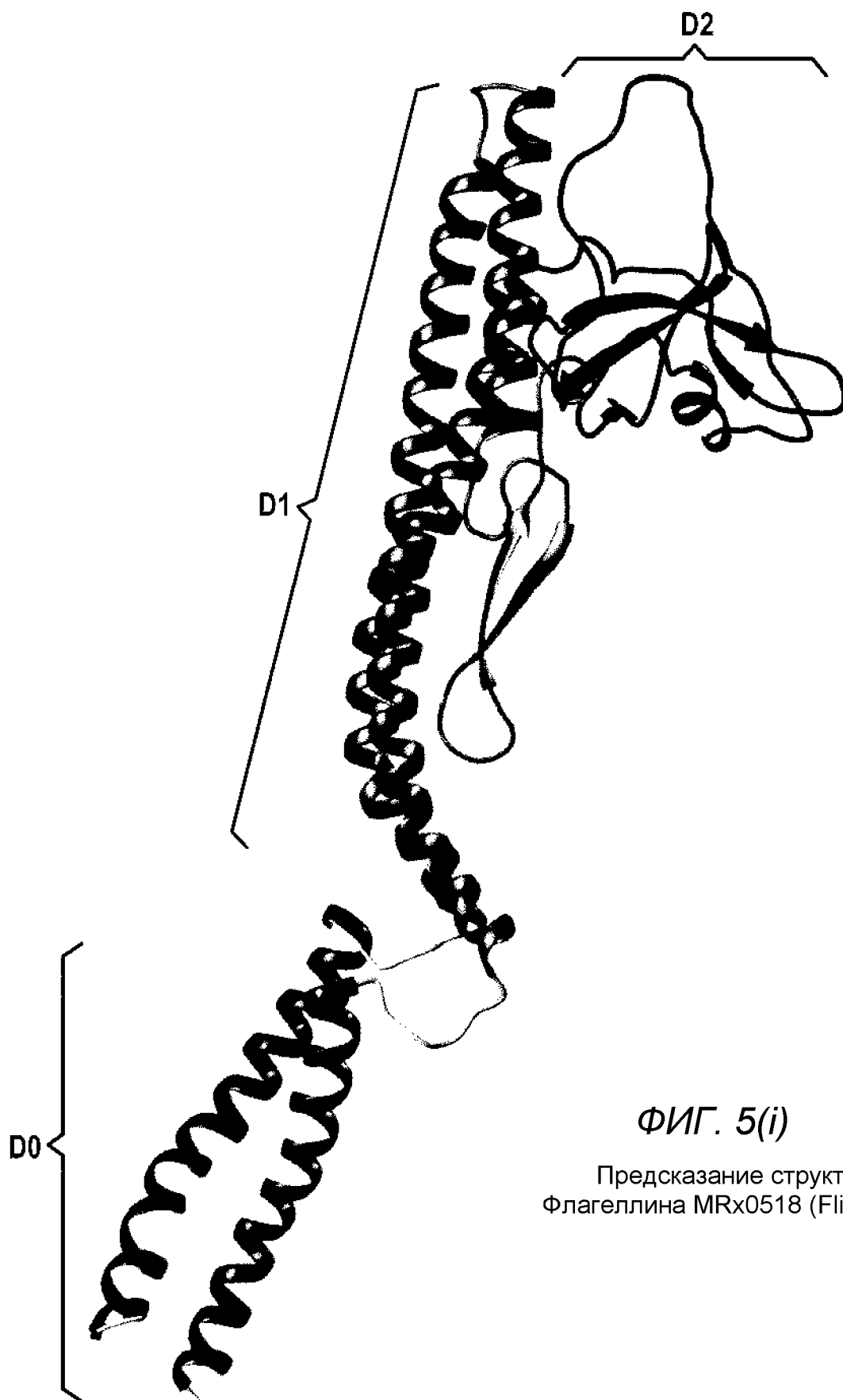
Пояснение



ФИГ. 4

Сборки жгутиков



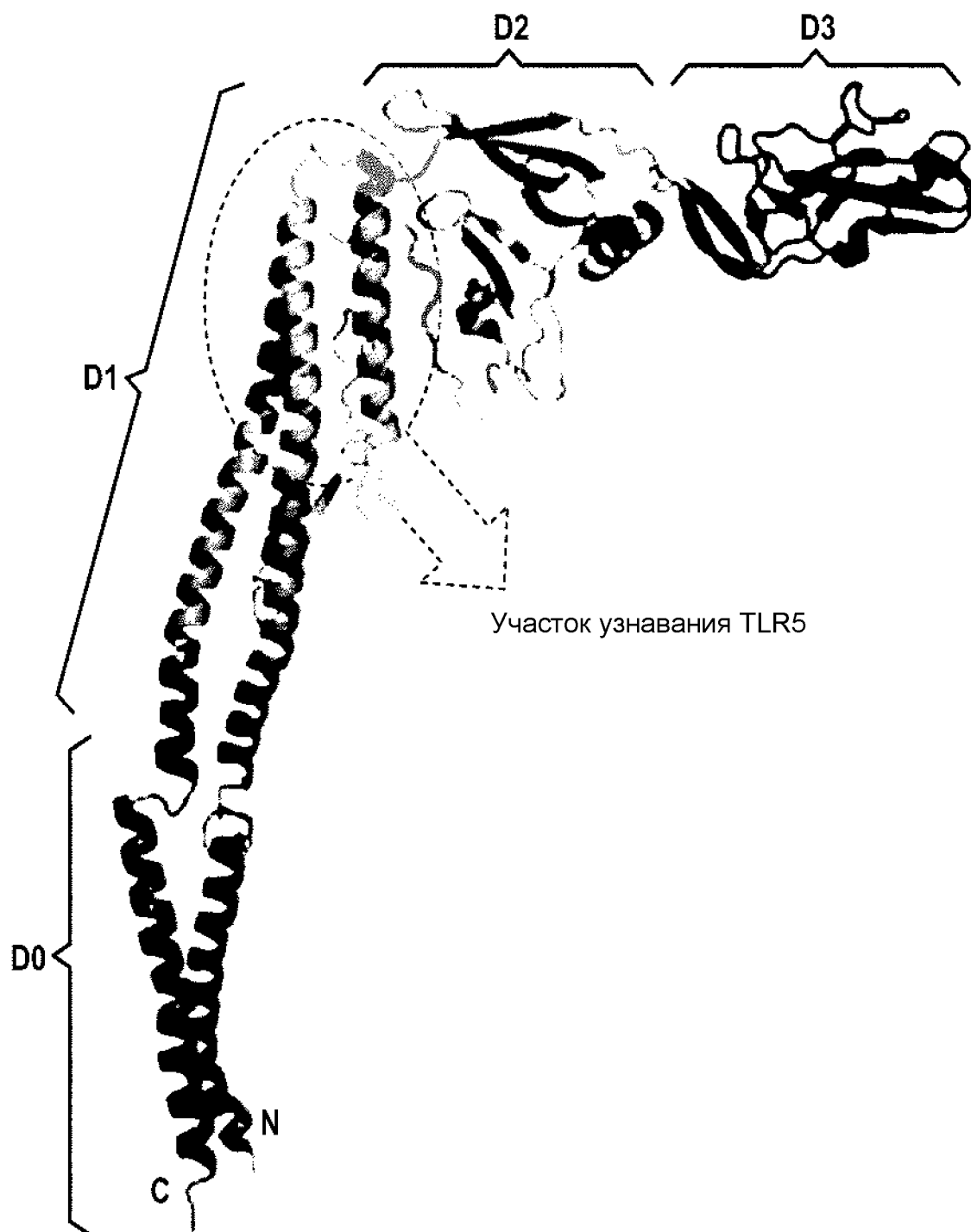


ФИГ. 5(i)

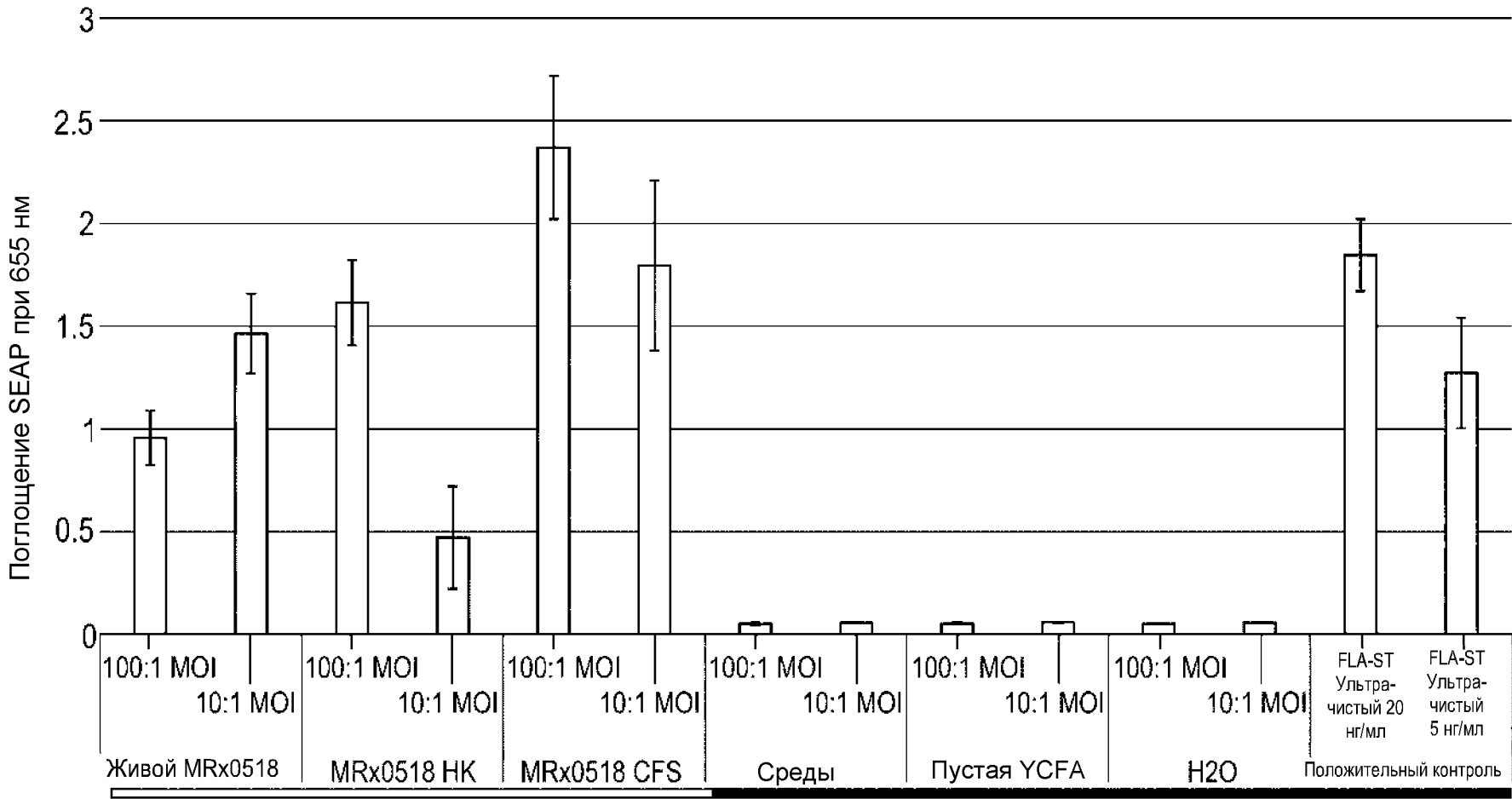
Предсказание структуры
Флагеллина MRx0518 (FliC_{MRx0518})

ФИГ. 5(ii)

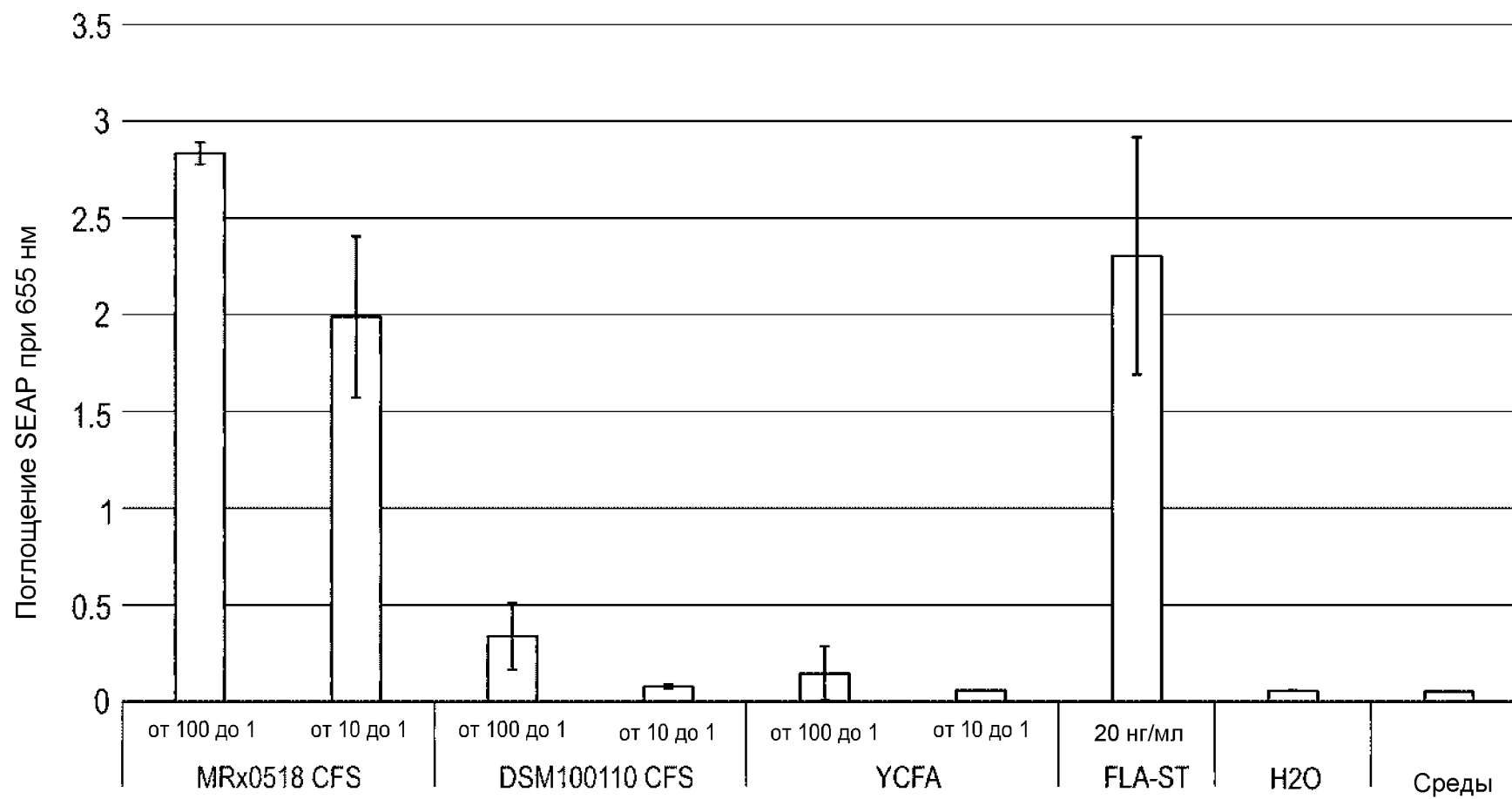
Структура белка флагеллина *Salmonella typhimurium*



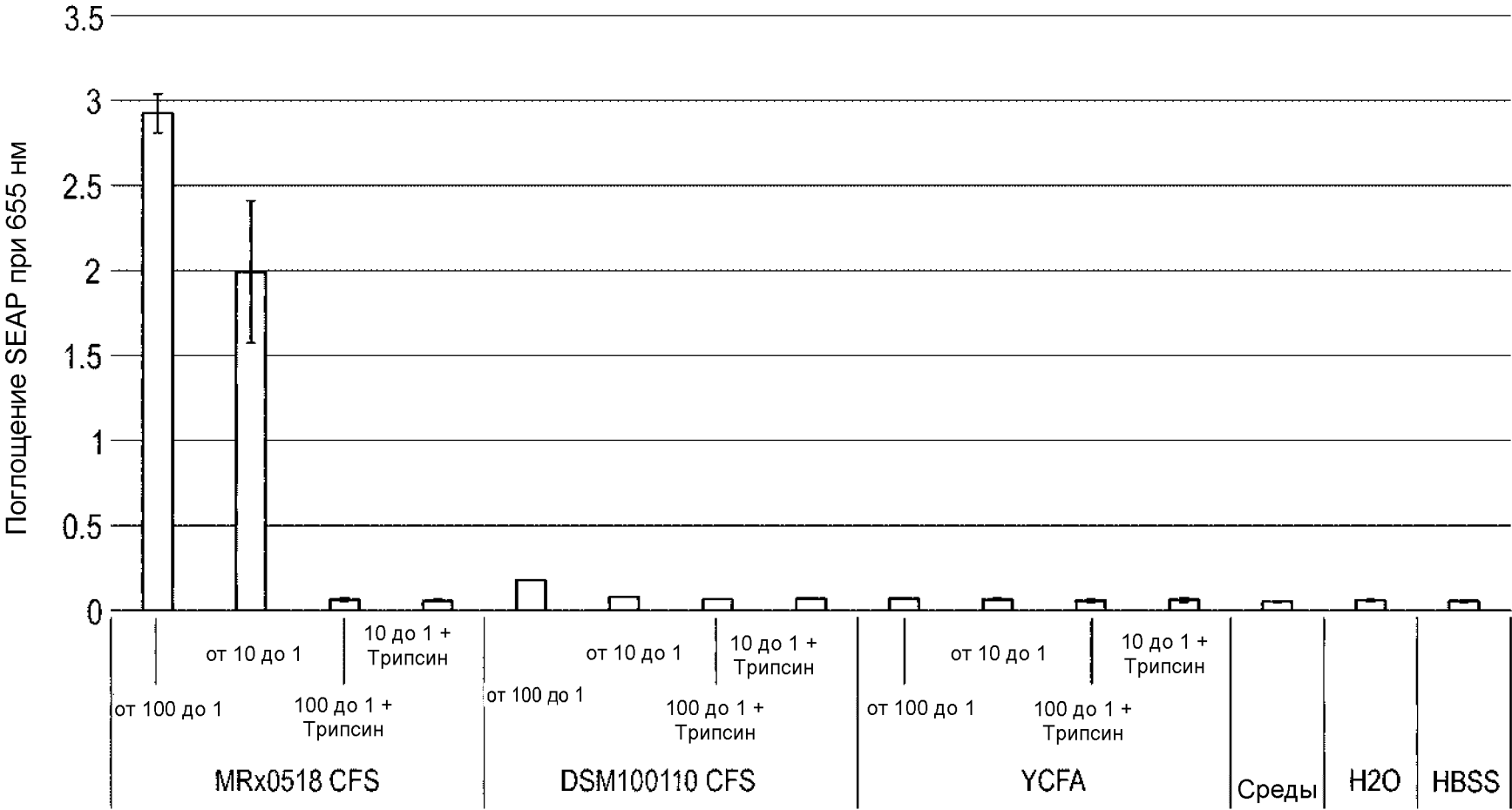
ФИГ. 6

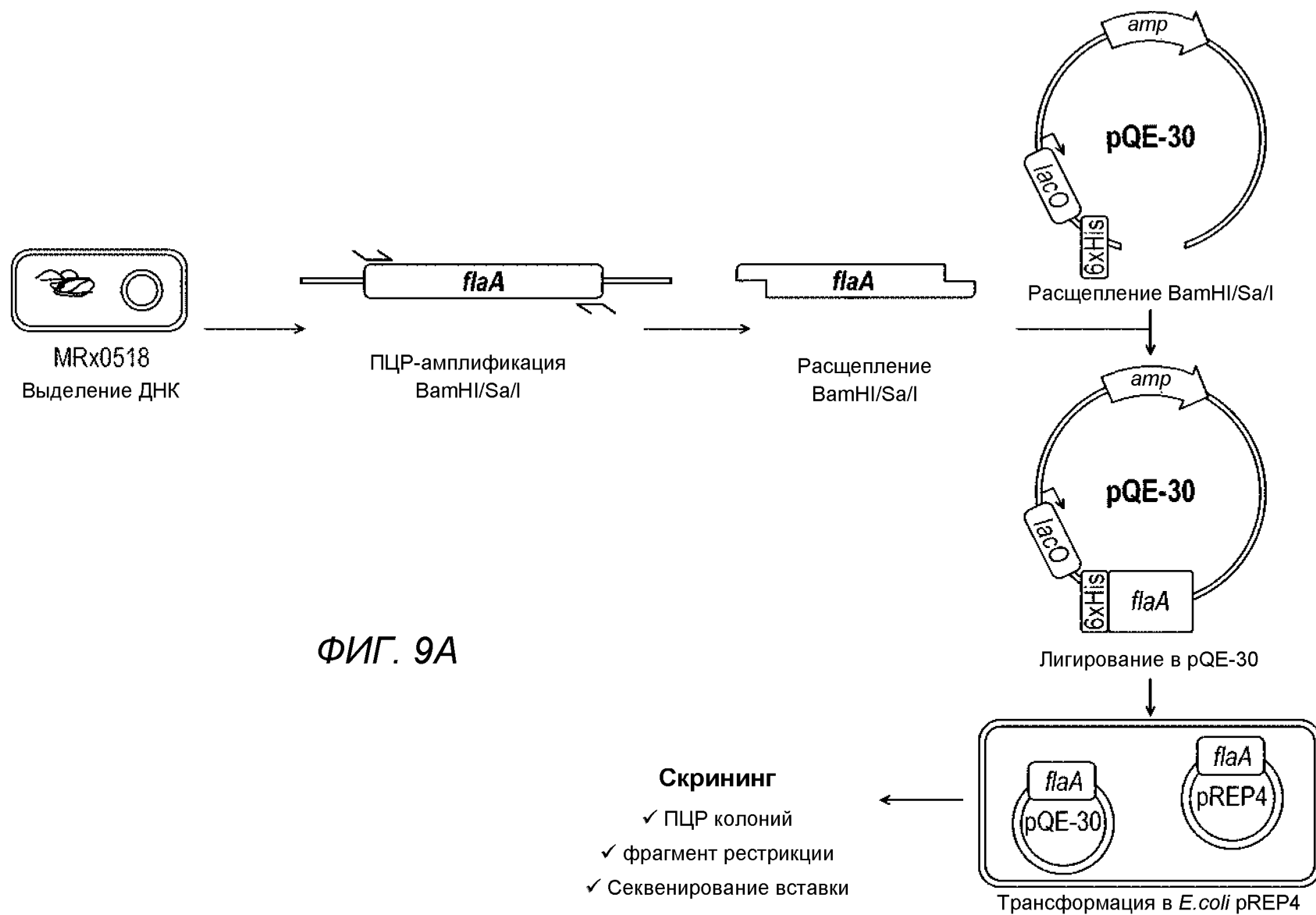


ФИГ. 7



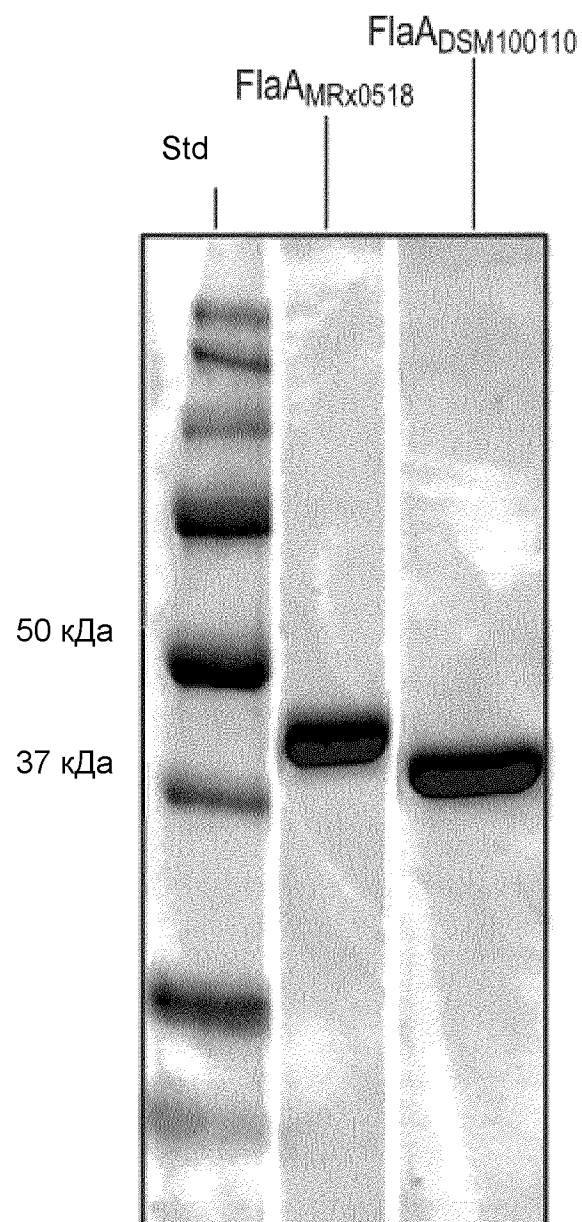
ФИГ. 8



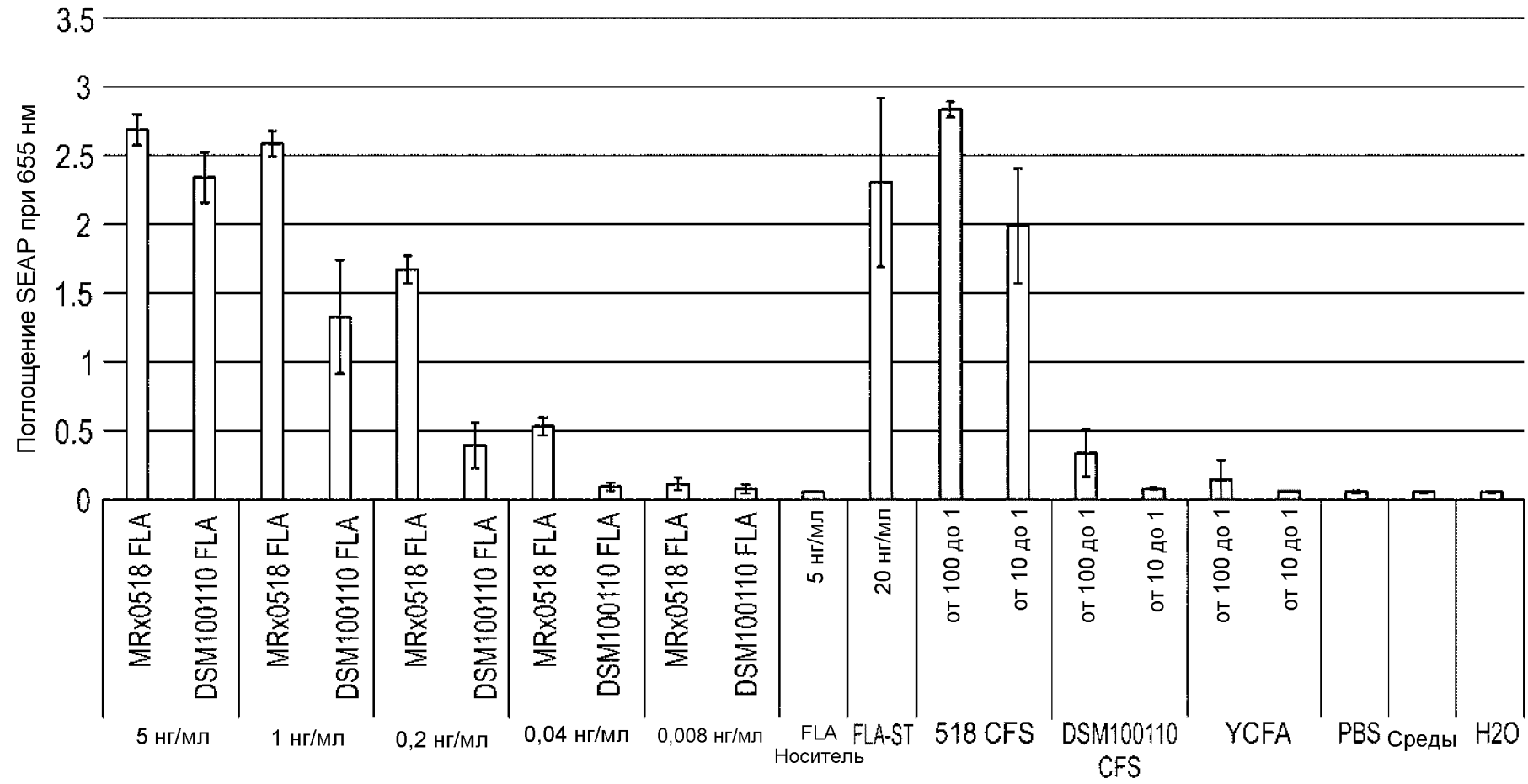


ФИГ. 9А

ФИГ. 9В



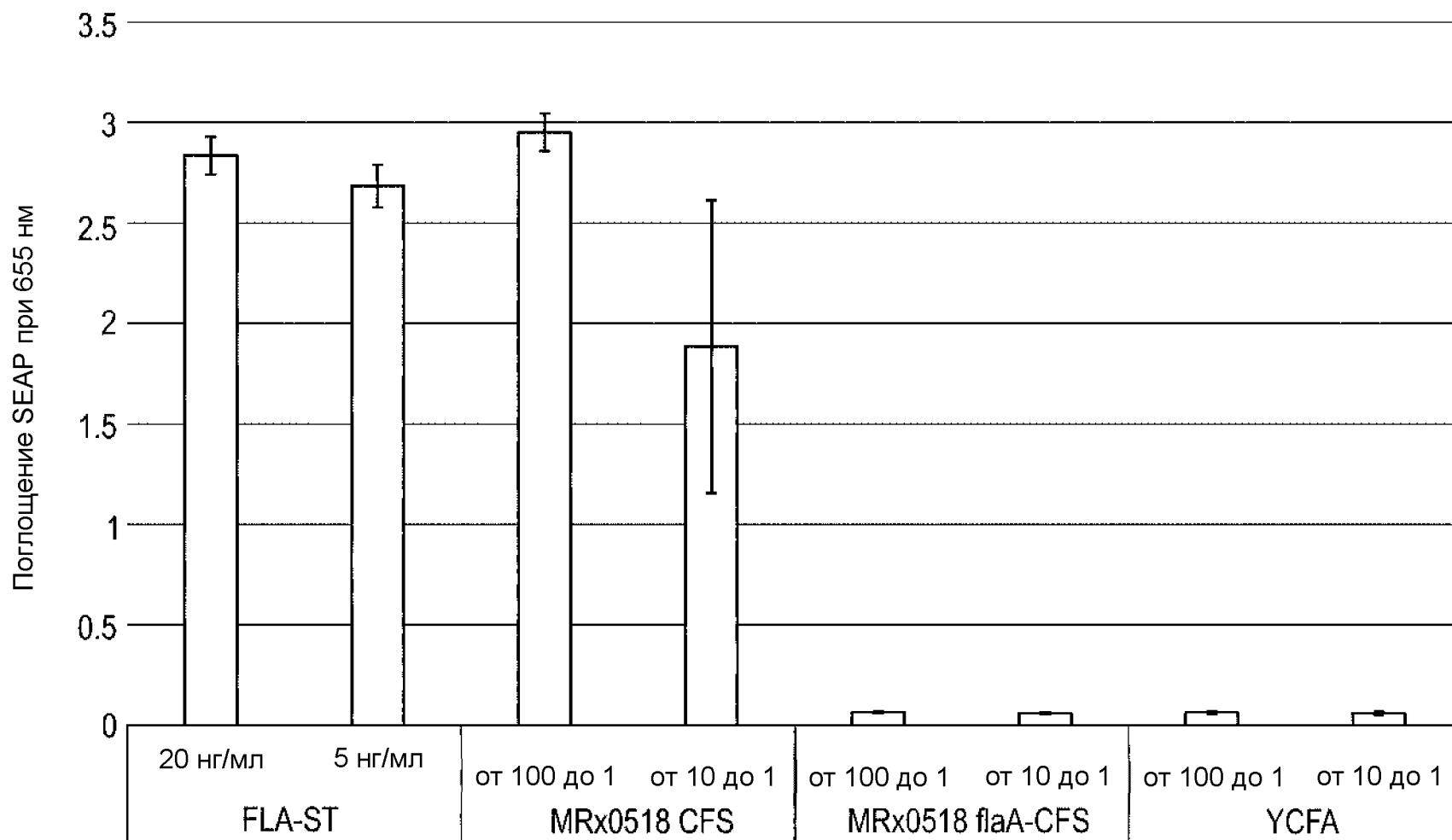
ФИГ. 10



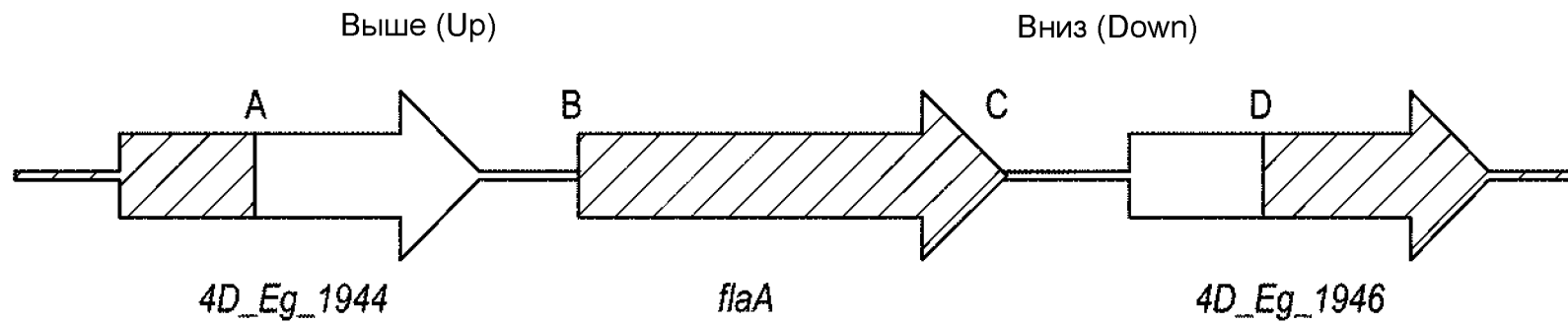
ФИГ. 11



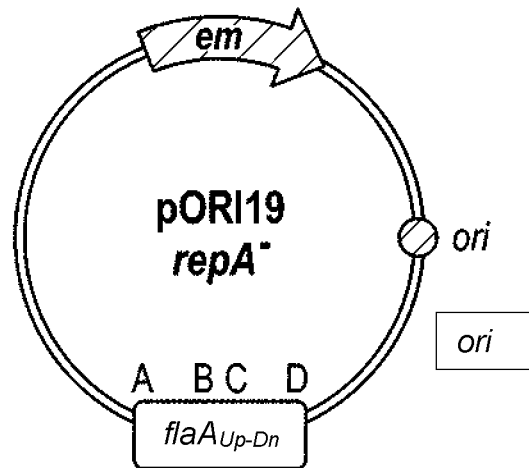
ФИГ. 12



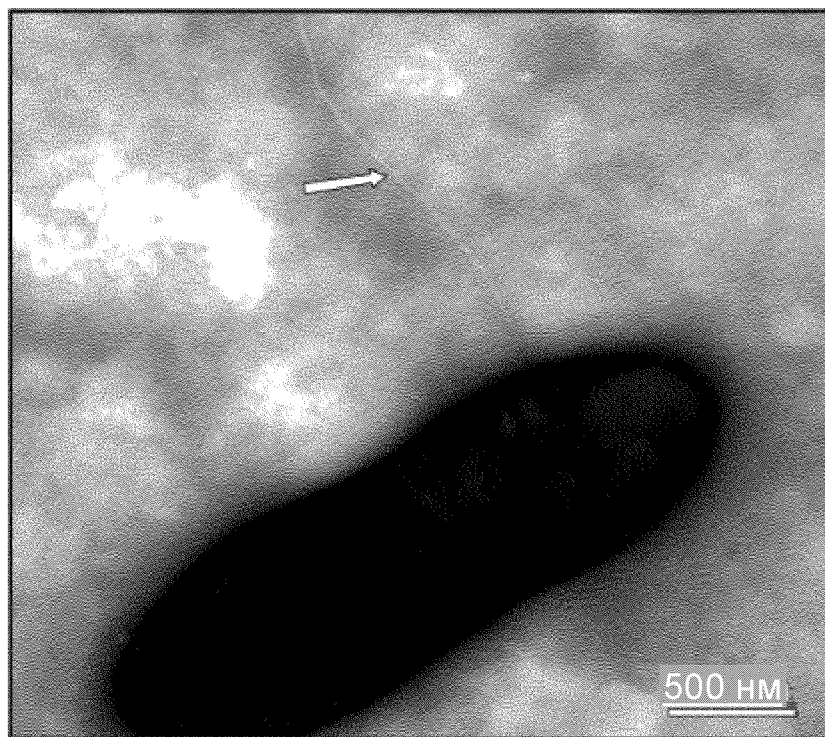
ФИГ. 13



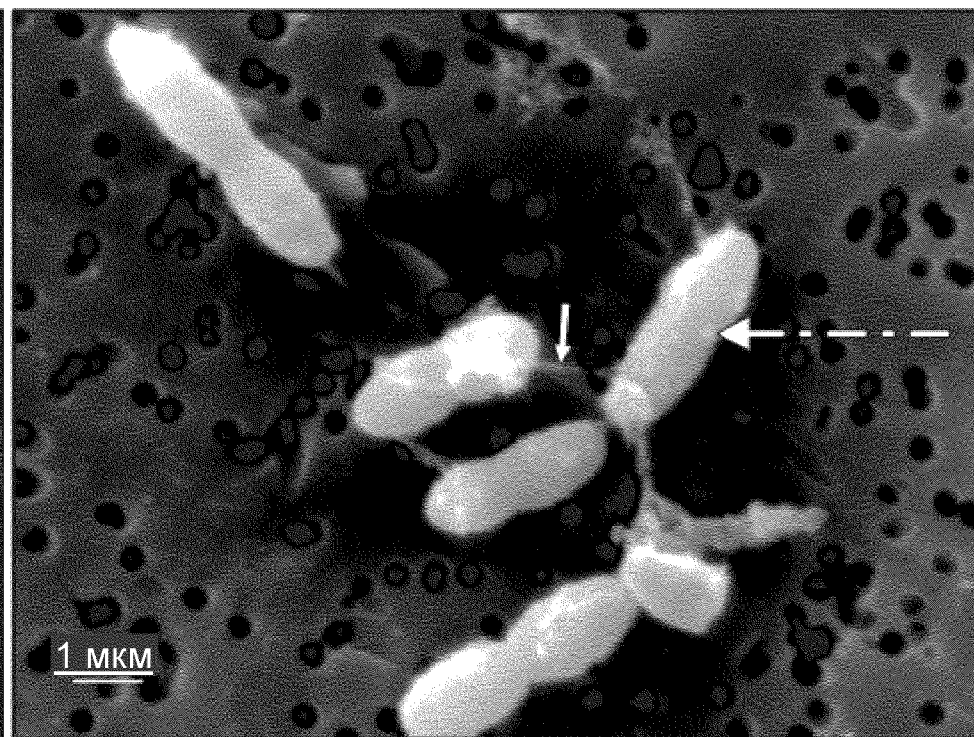
▼ ПЦР-клонирование с перекрывающимися праймерами



ФИГ. 14

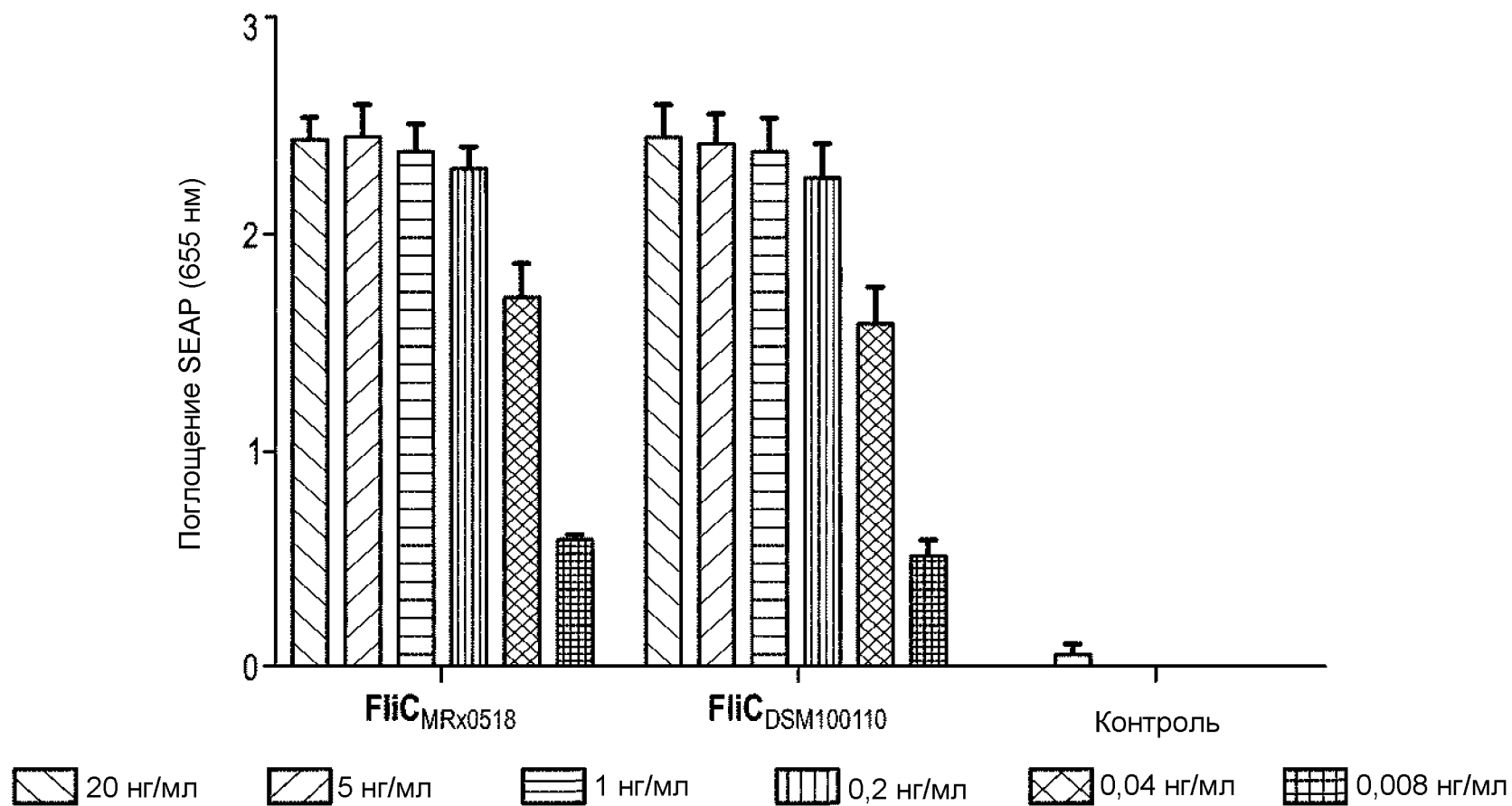


Трансмиссионная электронная микрофотография



Сканирующая электронная микрофотография

ФИГ. 15



MRx0518 MRINTNVSA LNTYSRLTAANASKSNSLSKLSSGLRINKAGDDAAGLAISEKMKGQIGGLS 60
 DSM100110 MRINTNVSA LNTYSRLTAANASKSNSLSKLSSGMRINKAGDDAAGLAISEKMKGQIGGLS 60

MRx0518 QAKSNAQDGISLIQTAEGALNETHSILGRMRDLAVQSSNGT L SDDDRSAINKEYTALSDE 120
 DSM100110 QAKSNAQDGISLIQTAEGALNETHSILGRMRDLAVQSSNGT L STDDREAI SKEFSALSDE 120

MRx0518 IDRIRD TTEFNTKSLLTG-EGDDAKSFTFQIGANANQTMSVSITNMSSTALKVKGLDLTQ 179
 DSM100110 IDRISTTTEFNTKSLLKGGESGEKASFIFQIGANANQTMSVKIGDMGAKALGVDALKLEE 180

MRx0518 AFATSDIAAAKDKAVAAAFKADTTTKYAADGKVDAAAGKTVADLQTAIDTAADDAAKATA 239
 DSM100110 AKDAESEIAK--KVETAF L DAANSOKYDADGKIDASAGKTA AELKDAIENAADDTAKAAA 238
 * :.. * * . : * :. * . : ** ***** : ** :. ***** : ***** *

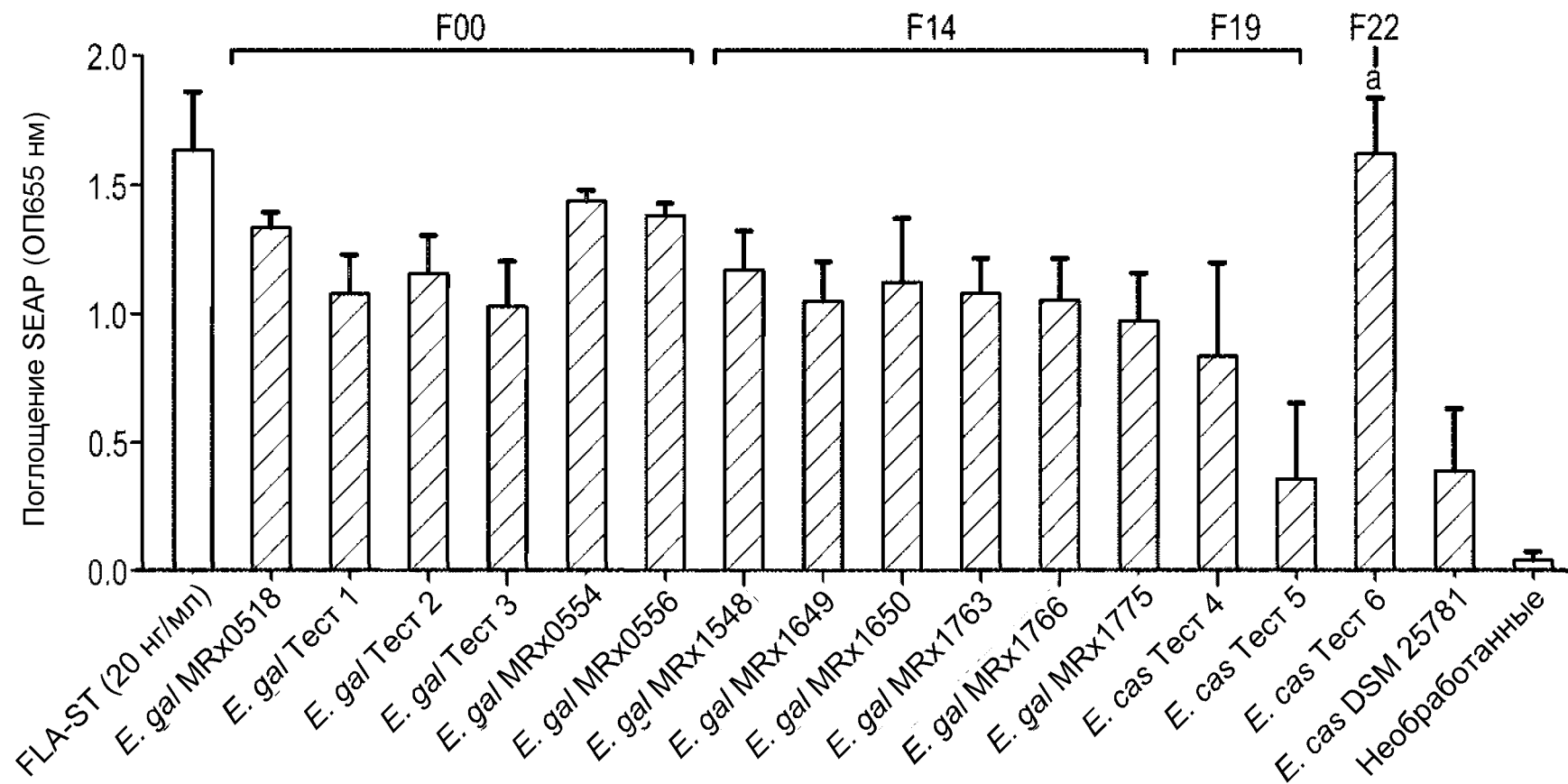
MRx0518 QKTYDDALATFTASDEGKAAAAAAETAIVENNP---ITKIDKAIKAVSAQRADLGAAQNR 296
 DSM100110 QKTYDAALET F KASTNGQTAIATAKTEVEEASKNSTVSKIDEA IKT VSAQRADLGAAQNR 298

MRx0518 LEHTINNLGTTQENLSEANSRIRDVDMAQEMMSFTKSNILSQAATSM LAQANSMPNSVLS 356
 DSM100110 LEHTINNLGTTQENLSEANSRIRDVDMAQEMMSFTKSNILSQAATSM LAQANSMPNSVLS 358

MRx0518 LLQG 360
 DSM100110 LLQ- 361

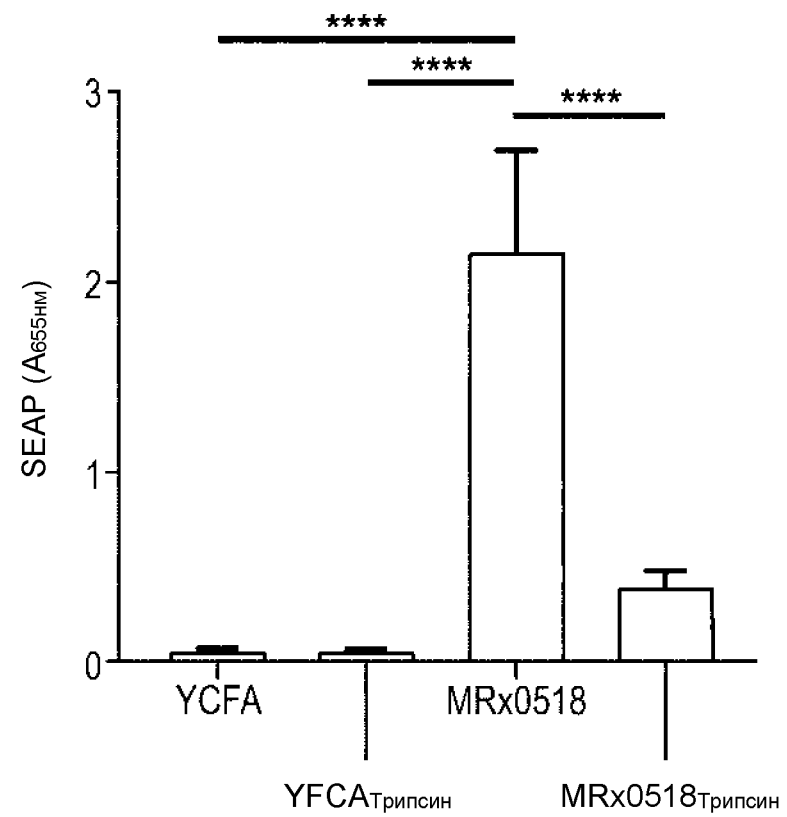
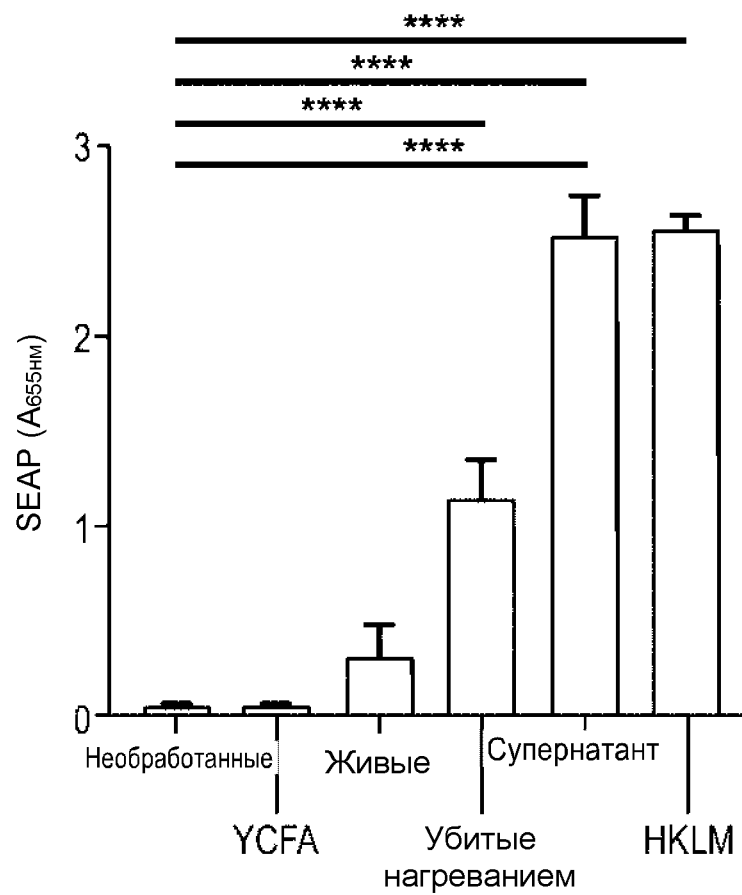
ФИГ. 16

ФИГ. 17

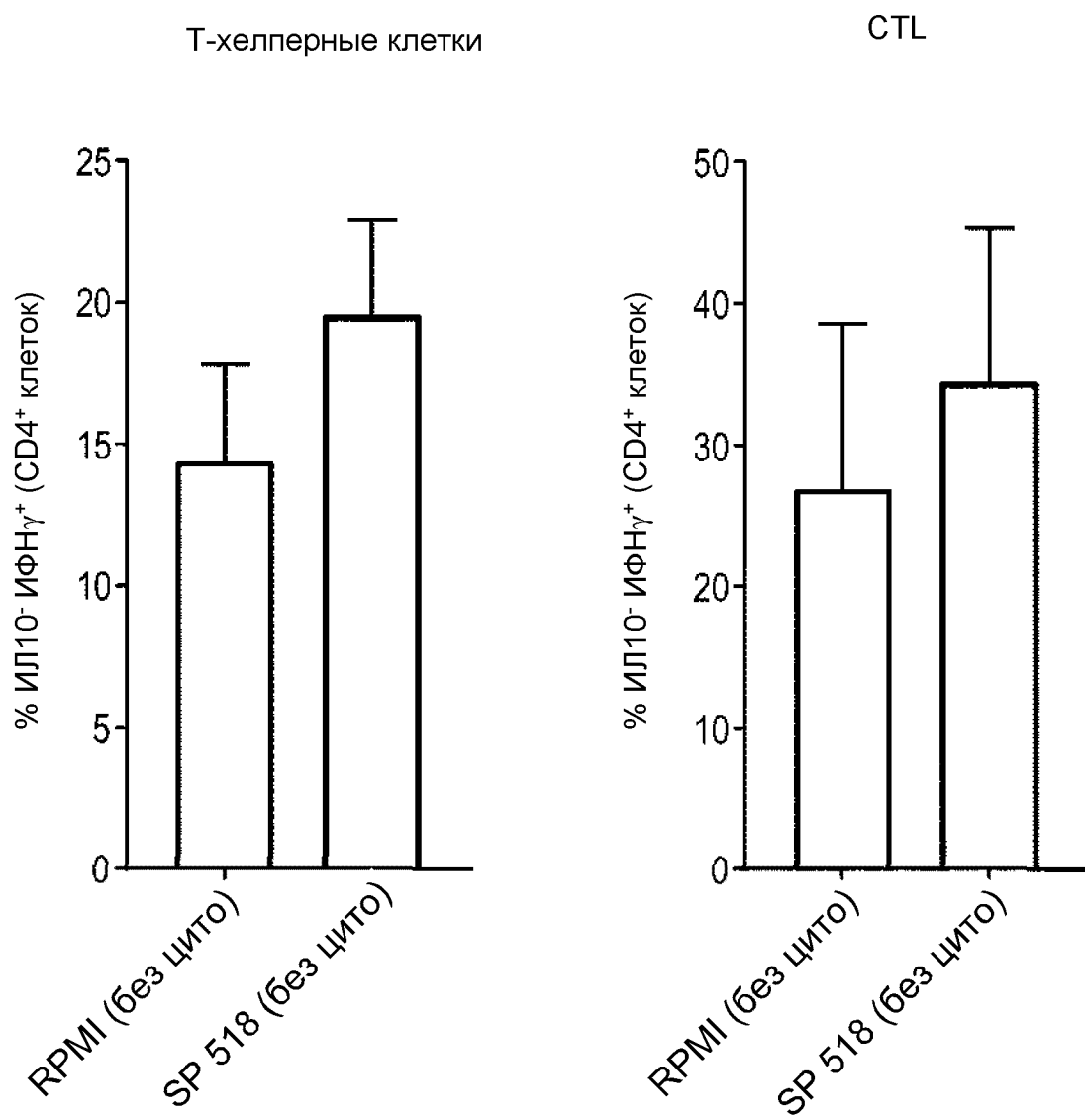


ФИГ. 18

NF-κB



ФИГ. 19



ФИГ. 20

